

# Kirjallisuuskatsaus Dopamiinitransportteri

## Kokeellinen osa

GDNF:n merkitys addiktiossa: Amfetamiinin vaikutus  
striatumin dopamiinipitoisuuteen MEN2B- ja  
GDNF-cKO-hiirikannoilla

Heidi Montonen  
Helsingin yliopisto  
Farmasian tiedekunta  
Farmakologian ja  
toksikologian osasto

Joulukuu 2012

Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty		Laitos/Institution – Department	
Farmasian tiedekunta		Farmakologian ja toksikologian osasto	
Tekijä/Författare – Author			
Heidi Montonen			
Työn nimi / Arbetets titel – Title			
<b>Kirjallisuuskatsaus:</b> Dopamiinitransportteri <b>Kokeellinen osa:</b> GDNF:n merkitys addiktiossa: Amfetamiinin vaikutus striatumin dopamiinipitoisuuteen MEN2B- ja GDNF-cKO-hiirikannoilla			
Oppiaine /Läroämne – Subject			
Farmakologia			
Työn laji/Arbetets art – Level	Aika/Datum – Month and year	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages	
Pro-Gradu	Joulukuu 2012	76	
Tiivistelmä/Referat – Abstract			
<p><b>Kirjallisuuskatsaus:</b> Solukalvolla sijaitseva aktiivinen kuljetusproteiini, dopamiinitransportteri (DAT) on yksi elimistön kolmesta monoamiinitransportterista. DAT:n tärkein tehtävä on solunulkoisen dopamiinipitoisuuden säätely ja dopaminergisen neurotransmission päättäminen. Kiinnostus DAT:a ja se toimintaa kohtaan on suuri, sillä sen substraatti, dopamiini, osallistuu useiden fysiologisten toimintojen kuten liikeaktiivisuuden, kognition ja tunnetilojen säätelyyn. DAT kuljettaa solunulkoiseen tilaan vapautuneen dopamiinin takaisin presynaptiseen hermopäätteeseen vaikuttaen näin sekä dopamiinin vaikutuksen kestoon että intensiteettiin. Sen toiminta on tarkoin säädeltyä useiden proteiinikinaasien, fosfataasien ja proteiini-proteiini-interaktioiden avulla. DAT:n epänormaali toiminta on yhdistetty useisiin sairauksiin kuten Parkinsonin tautiin, addiktioon ja ADHD:en. DAT:n tutkimista varten on kehitetty myös useita muuntogeenisiä eläinmalleja, kuten DAT-poistogeeninen hiirikanta, DAT knock down -hiirikanta, sekä DAT:a yli-ilmentävä knock in -hiirikanta.</p> <p><b>Kokeellinen osa:</b> Gliaolulinjaperäisellä hermokasvutekijällä (GDNF) on tärkeä rooli dopamiinihermosolujen toiminnassa ja selviytymisessä sekä oppimisen ja muistin säätelyssä. Nyt tehdyn tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää GDNF:n roolia ja toimintamekanismeja striatumiin synapsoivien dopamiini-neuronien toiminnassa ja plastisuudessa. Tutkimuksessa käytettiin kahta muuntogeenistä hiirikantaa. MEN2B-hiiriä, joilla GDNF:n signaalintireseptori Ret on jatkuvasti aktiivinen ja kohonnut striatumin dopamiinipitoisuus, sekä konditionaalista poistogeenistä hiirikantaa, jolta GDNF on poistettu keskushermostosta. Tutkimusmenetelmänä käytettiin <i>in vivo</i> -mikrodialyysia vapaasti liikkuvilla hiirillä. Hiirille asennettiin anestesiassa ohjauskanyyli dorsaaliseen striatumiin, minkä jälkeen ne saivat toipua 5-7 päivää. Mikrodialyysi suoritettiin hiirille yhteensä kaksi kertaa, päivinä 1 ja 4. Välipäivinä hiirille annettiin amfetamiinia 1 mg/kg i.p., jotta pystyttäisiin näkemään toistuvan amfetamiiniannostelun vaikutus. Mikrodialyysissa hiirille annettiin amfetamiinistimulaatio 100 µM, 60 min. Näytteistä määritettiin HPLC:llä dopamiinin ja sen metaboliittien DOPAC:n ja HVA:n sekä 5-HIAA:n pitoisuudet. Mikrodialyysikoettimen paikka tarkistettiin kokeiden jälkeen aivoleikkeistä.</p> <p>Dopamiinivaste amfetamiinille saatiin selvästi näkyviin kummallakin hiirikannalla. Genotyyppien välistä eroa ei kuitenkaan havaittu, sillä amfetamiinin aiheuttaman nousu striatumin dopamiinipitoisuudessa ei poikennut tilastollisesti merkittävästi villityypin hiiristä niin akuutisti kuin toistetustikaan annosteltuna. Tulos ei siis tue näkemystä siitä, että GDNF:llä olisi merkittävää roolia toistuvan amfetamiiniannostelun aiheuttamissa plastisissa muutoksissa striatumissa. Päiväefekti saatiin kuitenkin esille ensimmäisen ja toisen mikrodialyysin välillä, sillä striatumin dopamiinipitoisuudet olivat selvästi matalammat toisena mikrodialyysipäivänä. Tämä kertoo todennäköisesti merkittävän toleranssin kehitymisestä. Lisätutkimukset ovat kuitenkin vielä tarpeellisia GDNF:n lopullisen roolin selvittämiseksi addiktiossa. Erot genotyyppien välillä voivat olla niin pieniä, ettei niitä havaita mikrodialyysillä. On myös mahdollista, että hiirille on kehittynyt mekanismeja, jotka kumoavat GDNF:n puuttumisen tai Ret:n jatkuvan aktiivisuuden vaikutuksia. Vaikutukset saattavat myös vaihdella eri aivoalueilla.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords			
Dopamiinitransportteri, GDNF, MEN2B, Ret, amfetamiini, mikrodialyysi, neurotransmissio, dopamiini			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited			
Farmakologian ja toksikologian osasto			
Muuta tietoa – Övriga uppgifter – Additional information			
Ohjaajat: Jaakko Kopra ja Petteri Piepponen			

Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty		Laitos/Institution – Department	
Faculty of Pharmacy		Division of Pharmacology and Toxicology	
Tekijä/Författare – Author			
Heidi Montonen			
Työn nimi / Arbetets titel – Title			
<b>Literature review:</b> Dopamine transporter <b>Experimental part:</b> GDNF's role in addiction: Effects of amphetamine on striatal dopamine concentrations in MEN2B and GDNF-cKO mice			
Oppiaine /Läroämne – Subject			
Pharmacology			
Työn laji/Arbetets art – Level	Aika/Datum – Month and year	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages	
Master's Thesis	December 2012	76	
Tiivistelmä/Referat – Abstract			
<p><b>Literature review:</b> The plasma membrane DA transporter (DAT) belongs to the family of Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> dependent neurotransmitter transporters. DAT is the primary mechanism for clearance of dopamine from the extracellular space and transporting it back to the presynaptic nerve terminals. There's a great interest in the DAT and its regulation as its substrate, dopamine, mediates a wide array of physiological functions e.g. locomotor activity, cognition and the control of motivated behaviors. With selective transport DAT limits the intensity and the duration of dopaminergic signal. Its function is regulated by several kinases, phosphatase and protein-protein interactions. The altered expression of DAT may be related to several neurological diseases such as Parkinson's disease, addiction and ADHD. To study DAT's function, several genetically modified mouse lines including DAT knockout mice, DAT knockdown mice and DAT knock in mice with elevated DAT levels have been generated.</p> <p><b>Experimental part:</b> Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) plays important role in the survival and function of dopaminergic neurons, learning, memory and synaptic plasticity. More recently, several studies have shown that GDNF can also negatively regulate the actions of abused drugs. The aim of this study was to investigate GDNF's role and mechanism of action in plasticity and function of the dopaminergic neurons projecting to striatum. For that purpose, we used <i>in vivo</i> microdialysis in freely moving mice. We chose two different mouse lines: MEN2B mice with constitutive active Ret-signaling and elevated striatal dopamine concentrations, and GDND-cKO mice that lack GDND in the central nervous system. Microdialysis guide cannula was implanted in the dorsal striatum in the stereotaxic surgery and the mice were allowed to recover for 5-7 days. The concentrations of dopamine and its metabolites DOPAC and HVA and also 5-HIAA were determined from the samples by high-performance liquid chromatography. Microdialysis was performed twice for every mouse on days 1 and 4. Between microdialysis days, the mice were given amphetamine 1 mg/kg i.p. on days 2 and 3. In the microdialysis experiment, the mice received amphetamine stimulation (100 µM/60 min) via microdialysis probe. The placements of microdialysis probes were verified from fixed brain sections after the experiments.</p> <p>Amphetamine increased the dopamine output in both mouse lines, but there were no statistically significant differences in striatal dopamine concentrations between genotypes neither after acute nor chronic administration. However, there was a difference between the dopamine outputs in days 1 and 4 in both MEN2B and GDNF-cKO mice: The striatal dopamine concentrations were significantly lower on the second microdialysis day. This may be a sing from tolerance to the drug. However, without more research, it is not possible, by this experiment, to draw direct conclusions of GDNF's role in addiction and in plasticity in striatum. It is possible that the differences between genotypes are too small to be seen with microdialysis. Development of compensatory mechanisms in mice cannot be ruled out either. Effects may also vary between different brain areas.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords			
Dopamine transporter, GDNF, MEN2B, Ret, amphetamine, microdialysis, neurotransmission, dopamine			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited			
Division of Pharmacology and Toxicology			
Muuta tietoa – Övriga uppgifter – Additional information			
Supervisors: Jaakko Kopra and Petteri Piepponen			

## SISÄLLYSLUETTELO

I KIRJALLISUUSKATSAUS .....	1
1 JOHDANTO .....	1
2 DAT:N MOLEKYYLIBIOLOGIA.....	3
2.1 Rakenne.....	3
2.2 Sijainti ja jakautuminen .....	5
3 DAT:N TOIMINTAMEKANISMI.....	6
4 DAT:N TOIMINNAN SÄÄTELY .....	9
4.1 Fosforylaatio, internalisaatio ja proteiinikinaasit .....	12
4.2 Dopamiinin D2- ja D3-autoreseptorit .....	16
4.3 N-linkitetty glykosylaatio .....	17
4.4 Jännitteestä riippuvainen säätely .....	17
4.5 Proteiini-proteiini-interaktiot .....	18
4.6 Muut yhdisteet ja reseptorit.....	20
5 DAT:N FARMAKOLOGIA .....	22
5.1 Antagonistit .....	22
5.2 Substraatit.....	24
5.3 Agonistit.....	26
6 DAT:N JA SEN POLYMORFIOIDEN MERKITYS SAIRAUKSISSA .....	27
6.1 Alkoholi- ja huumausaineriippuvuus.....	28
6.2 ADHD .....	30
6.3 Masennus .....	30
6.4 Parkinsonin tauti.....	31
7 DAT-ELÄINMALLIT.....	32
7.1 DAT knock out -hiiret.....	33

7.2 DAT knock down -hiiret .....	34
7.3 DAT knock in -hiiret.....	35
8 YHTEENVETO .....	36
II KOKEELLINEN OSA.....	39
1 JOHDANTO .....	39
2 MATERIAALIT JA MENETELMÄT .....	42
2.1 Koe-eläimet .....	42
2.2 Tutkittavat lääkeaineet .....	44
2.3 Stereotaktinen leikkaus .....	44
2.4 Mikrodialyysi .....	45
2.5 Aivojen dissekaatio ja aivoleikkeet .....	47
2.6 Tilastolliset menetelmät .....	47
3 TULOKSET .....	48
3.1 Dopamiinivaste MEN2B-hiirillä .....	48
3.2 Dopamiinivaste GDNF-cKO-hiirillä .....	48
3.3 Dopamiinin metaboliitit ja 5-HIAA.....	51
3.4 Aivoleikkeet .....	51
4 POHDINTA .....	51
4.1 MEN2B-hiiret.....	53
4.2 GDNF-cKO-hiiret.....	55
4.3 Käytettyjen menetelmien vaikutukset.....	57
4.4 Tulosten soveltaminen .....	58
5 YHTEENVETO .....	59
KIRJALLISUUSLUETTELO .....	60
LIITTEET	

## LYHENTEET

3-MT	3-metoksityramiini
5-HIAA	5-hydroksi-indolietikkahappo
5-HT	5-hydroksitryptoamiini (serotoniini)
ADHD	Tarkkaavaisuus- ja ylivilkkaushäiriö
ANOVA	Varianssianalyysi (engl. analysis of variance)
ATP	Adenosiinitrifosfaatti
CAMKII	Ca <sup>2+</sup> /kalmoduulista riippuvainen kinaasi
cKO	Konditionaalinen poistogeeninen
COMT	Katekoli-O-metyylitransferaasientsyymi
D2	Dopamiinin D2-reseptori
D3	Dopamiinin D3-reseptori
DA	Dopamiini
DAT	Dopamiinitransportteri
DAT-KD	DAT-knock down
DAT-KO	DAT-knock out
DOPAC	3,4-dihydroksifenyylietikkahappo
ERK 1/2	Solunulkoisen säätelyn alainen proteiinkinaasi
FAK	Fokaalinen adheesiokinaasi
GABA	Gamma-aminovoihappo
GNDF	Gliasolulinjaperäinen hermokasvutekijä
GLYT	Glysiinitransportteri
Hic-5	Fokaalinen adheesioproteiini
HVA	Homovanilliinihappo
i.p.	Vatsaontelon sisäisesti
KO	Poistogeeninen (engl. knock out)
MAO	Monoamiinioksidaasi
MAPK	Mitogeenin aktivoima kinaasi
MEN2B	Multippeli endokriininen neoplasia syndrooma 2B
MPTP	1-metyyli-4-fenyyli-1,2,3,6-tetrahydropriniidi
MPP+	1-metyyli-4-fenyylipriniidi-ioni

NCAM	Neuronaalinen solujen adheesiomolekyyli
NET	Noradrenaliinitransportteri
NMDA	N-metyyli-D-aspartaatti
NURR1	Tumareseptoriin liittyvä proteiini 1
PI3K	Fosfatidyli-inositoli 3 -kinaasi
PICK1	PKC:en sitoutuva $\alpha$ -proteiini
PKA	Proteiinikinaasi A
PKC	Proteiinikinaasi C
PMA	Forboli-12-myristaatti-13-asetatti
PP1	Proteiinifosfataasi 1
PP2A	Proteiinifosfataasi 2A
Ret	Ret-reseptorityrosiinikinaasi (engl. rearranged during transfection)
SEM	Keskiarvon keskivirhe (engl. standard error of the mean)
SERT	Serotoniinitransportteri
SNpc	Substantia nigra pars compacta
SPECT	Yksifotoniemissiotomografia
TH	Tyrosiinihydroksylaasi
VMAT2	Vesikulaarinen monoamiinitransportteri 2
VTA	Ventraalisen tegementumin alue

Kirjallisuuskatsaus  
Dopamiinitransportteri



## I KIRJALLISUUSKATSAUS

### 1 JOHDANTO

Solukalvolla sijaitseva aktiivinen kuljetusproteiini, dopamiinitransportteri (DAT) on yksi elimistön kolmesta monoamiinitransportterista (Torres ym. 2003b). Sen tärkein tehtävä on solunulkoisen dopamiinipitoisuuden säätely ja dopaminergisen neurotransmission päättäminen. Se hoitaa tätä tehtävää kuljettamalla vapautunutta dopamiinia solunulkoisesta tilasta takaisin presynaptiseen hermopäätteeseen. Tällä dopamiinin selektiivisellä takaisinotolla DAT pystyy vaikuttamaan sekä dopamiinin vaikutuksen kestoon että intensiteettiin pre- ja postsynaptisissa reseptoreissa.

Kiinnostus DAT:n toimintaan ja sen tutkimiseen johtuukin juuri sen substraatista dopamiinista, koska sillä on merkittävä rooli elimistön normaalin toiminnan kannalta (Molinoff ja Axelrod 1971; Sotnikova ym. 2006). Dopamiini muun muassa ohjaa useita keskushermoston toimintoja kuten liikeaktiivisuutta, kognitiota ja tunteita, ja säätelee umpieritteisten hormonien vapautumista sekä aivojen palkitsemisjärjestelmää. Se on yhdistetty myös riippuvuuden kehittymiseen, vaikka sen rooli tässä onkin osin kiistanalainen (Berridge 2007). Sillä on tärkeä rooli keskushermoston nopean glutaminergisen ja GABAergisen neurotransmission säätelyssä (Carlsson ym. 2001). Periferiassa dopamiini puolestaan vaikuttaa katekoliamiinien vapautumiseen, kardiovaskulaarisiin toimintoihin, verisuonten tonuksen säätelyyn, hormonien eritykseen ja ruoansulatuskanavan motiliteettiin (Missale ym. 1998). Häiriöt dopamiinijärjestelmän toiminnassa on liitetty useisiin neurologisiin sairauksiin kuten masennukseen, tarkkaavaisuus- ja ylivilkkaushäiriöön (ADHD), Parkinsonin tautiin, skitsofreniaan, Touretten syndroomaan ja huumeaddiktioon (Robbins ja Everitt 1999; Müller-Vahl ym. 2000; Dunlop ja Nemeroff 2007; Cilia ym. 2010; Fusar-Poli ym. 2012).

Dopamiinin vaikutukset elimistössä välittyvät G-proteiinikytkentäisten dopamiinireseptorien (D1-D5) kautta (Missale ym. 1998). Erotuksena nopeasti

millisekunneissa toimiviin ligandivälitteisiin ionikanavareseptoreihin kuten GABA<sub>A</sub>-reseptoriin, G-proteiinikytkentäisten reseptorien välittämä viesti on hitaampi, ja vasteen esille tulo saattaakin kestää useita sekunteja. Vapautuneen dopamiinin vaikutuksen kesto soluvälitilassa on pääasiassa takaisinotosta riippuvaista, ja tehokkaimmin tämä onnistuu juuri DAT:n välityksellä. Dopamiinin vaikutus ei kuitenkaan kohdistu ainoastaan synapsiin, sillä sitä leviää myös laajalle alueelle synaptisen alueen ulkopuolelle, missä se aktivoi ekstrasynaptisia reseptoreita. Tämän takia myös DAT sijaitsee pääasiassa synaptisen alueen ulkopuolella. Toinen mahdollinen dopamiinin takaisinoton mekanismi on epäspesifinen soluunotto läheisiin hermotukisoluihin ja astrosyytteihin, mutta tällä on vain vähäinen merkitys suurimmassa osassa keskushermostoa (Samadi ym. 2007).

Normaalin dopaminergisen neurotransmission kannalta DAT:n toiminnan tarkka säätely on ensiarvoisen tärkeää (Schmitt ja Reith 2010). Lukuisat tutkimukset ovat osoittaneet, että monilla eri proteiinikinaaseilla ja fosfataaseilla on keskeinen osa tässä säätelyssä (Zhu ym. 1997; Foster ym. 2003; Fog ym. 2006). Ne pystyvät vaikuttamaan niin DAT:n ilmentymiseen, aktiivisuuteen, kuljetukseen kuin hajottamiseenkin. Lisäksi useiden eri reseptorien kuten dopamiinin D2- ja D3-reseptorien, sekä muiden yhdisteiden kuten etanolin, arakidonihapon ja typpioksidin vaikutuksia transportteriin on tutkittu paljon (Ingram ja Amara 2000; Kiss 2000; Lee ym. 2007; 2007; Zapata ym. 2007; Methner ja Mayfield 2010). Proteiini-proteiini-interaktiot ovat myös mahdollisia osatekijöitä säätelyssä samoin kuin oligomerisaatiokin, sillä DAT voi muodostaa oligomeerejä itsensä kanssa (Schmitt ja Reith 2010).

DAT on dopamiinin ohella myös useiden huumausaineiden sekä terapeuttisessa käytössä olevien lääkeaineiden, kuten amfetamiinin ja kokaiinin, sekä metyyylifenidaatin kohdemolekyyli (Usdin ym. 1991; Jones ym. 1998; Seeman ja Madras 1998). Nämä aineet sitoutuvat transportteriin ja muuttavat sen toimintaa niin, että dopamiinin vaikutuksen intensiteetti ja kesto keskushermostossa muuttuu.

Johtuen tästä keskeisestä roolista dopaminergisessä neurotransmissiossa, dopamiinitransportterilla onkin suuri terapeuttinen potentiaali tutkittaessa uusia hoitomahdollisuuksia erilaisiin hermostollisiin sairauksiin ja riippuvuuteen. DAT:n toiminnan parempi ymmärrys lisää myös tietoa neurologisten sairauksien taustalla

olevista mekanismeista. Avuksi tutkimukseen onkin kehitetty useita dopamiinitransportterin suhteen muuntogeenisiä eläinmalleja kuten DAT-poistogeenisiä tai sitä yli-ilmentäviä hiirikantoja (Giros ym. 1996; Zhuang ym. 2001; Salahpour ym. 2008).

## 2 DAT:N MOLEKYYLIBIOLOGIA

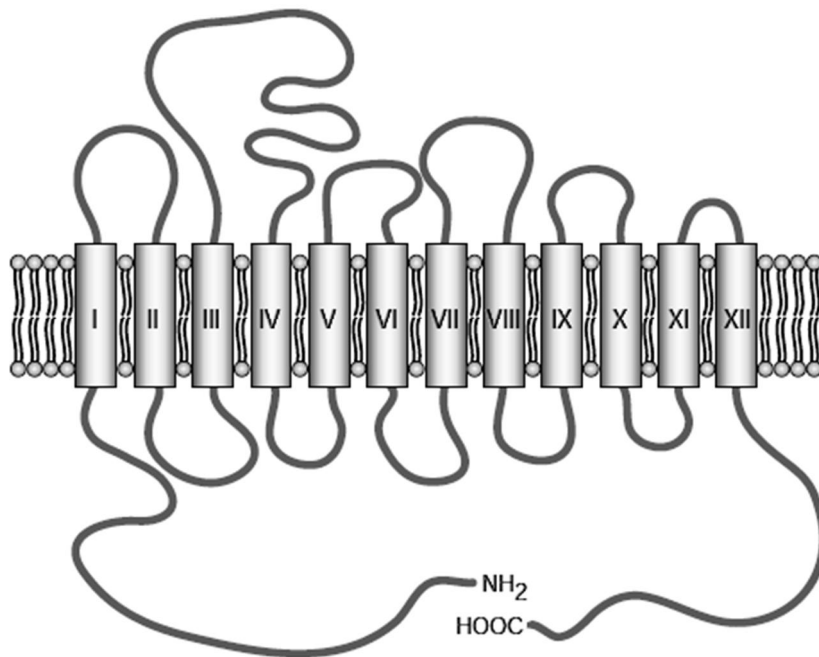
Solukalvon dopamiinitransportteri kuuluu solukalvon monoamiinitransportterigeeniperheeseen (Sotnikova ym. 2006; Merchant ja Madura 2012). Samaan ryhmään kuuluvat myös noradrenaliinitransportteri (NET) ja serotoniinitransportteri (SERT). Monoamiinitransportterit puolestaan kuuluvat suurempaan SLC6-ryhmään, joka käsittää  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ -välitteiset transportterit, joihin myös inhibitoriset glysiini- (GLYT 1a, 1b, 1c ja 2) ja gamma-aminovoihappo- (GABA 1-4), sekä L-proliini- (PROT), betaiini-, tauriini- (TAUT) ja kreatiinitransportterit kuuluvat (Sotnikova ym. 2006). Ne ovat kaikki välttämättömiä hermovälittäjäaineiden toiminnan rajoittamisessa niin keskus- kuin ääreishermostossakin.

### 2.1 Rakenne

Ihmisen DAT-geeni hDAT (SLC6A3) on tunnettu jo pitkään. Useat eri tutkimusryhmät kloonasivat sen ensimmäisen kerran vuonna 1991 samaan aikaan NET:n kanssa (Kilty ym. 1991; Usdin ym. 1991; Giros ym. 1992; Amenta ym. 2001). Se on tunnistettu useiden nisäkkäiden ohella myös sukkulamatojen (*Caenorhabditis elegans*) ja banaanikärpästen (*Drosophila melanogaster*) hermostosta (Jayanthi ym. 1998; Pörzgen ym. 2001).

Rakenteeltaan DAT on polytooppinen kalvotransportteri, eli se läpäisee solukalvon useammin kuin yhden kerran (Amenta ym. 2001). Ihmisen DAT-geeni sijaitsee kromosomin 5 lyhyessä käsivarressa kromosomialueella 5p15.3, ja se on 64 tuhannen

emäksen kokoinen (Giros ym. 1992). Siinä on 15 eksonia, joita erottaa 14 intronijaksoa. Tutkimukset ovat osoittaneet, että ihmisen DAT-geenissä on yksi transkription aloitusalue. Vaihtoehtoisesta RNA-silmikoinnista ei ole näyttöä (Torres ym. 2003b). Aminohappotähteitä on 620. Aminohapposekvenssin tiheys on suurin solukalvon läpäisevissä osissa, ja matalin amino- ja karboksipääteissä. DAT:n täydellinen rakenne on kuitenkin selvittämättä, sillä sille ei ole toistaiseksi pystytty mallintamaan kolmiulotteista kiderakennetta, kuten ei myöskään muille monoamiinitransporttereille (Merchant ja Madura 2012). Tämän hetkisen oletuksen mukaan siinä kuitenkin on 12 solukalvon läpäisevää osaa ja viisi solunulkoista ja kuusi solunsisäistä silmukkaa (Kuva 1) (Amenta ym. 2001). Kalvonläpäisevien osien kolme ja neljä välillä on suuri glykosyloitu rengas, ja proteiinilla on lisäksi sytoplasminen amino- ja karboksipääte (Torres ym. 2003b). Aminohapposekvenssi on konservoituneinta oletetuissa solukalvon läpäisevissä osissa ja vähiten konservoitunutta amino- ja karboksipääteiden alueella.



Kuva 1: Dopamiinitransportterin rakenne: Transportteri koostuu 12 solukalvon läpäisevästä osasta, sekä viidestä solunulkoisesta ja kuudesta solunsisäisestä silmukasta. Aminohappoketjun päissä on sytoplasmiset amino- ( $\text{NH}_2$ ) ja karboksi ( $\text{COOH}$ ) -pääteet (Torres ym. 2003b).

## 2.2 Sijainti ja jakautuminen

Keskushermostossa DAT:a esiintyy nigrostriataalisessa, mesolimbisessä ja mesokortikaalisessa dopamiiniradastossa substantia nigra pars compactan (SNpc), substantia nigra pars reticulatan, ventraalisen tegmentumin (VTA) ja striatumin alueella (Ciliax ym. 1995). Histokemialliset kokeet rotilla ovat osoittaneet, että mustan tumakkeen (substantia nigra) ja VTA:n dopamiinihermosoluissa on eniten DAT-mRNA:ta, mikä on oletettavaakin, sillä näillä alueilla sijaitsevat myös suurimmat dopaminergiset solukeskukset (Hoffman ym. 1998). Substantia nigrasta ja VTA:sta alkavien dopamiiniradastojen säikeet projisoivat edelleen striatumiin, akkumbens-tumakkeeseen, mantelitumakkeeseen ja etuaivokuorelle.

Pieniä määriä DAT:a on löydetty myös hypothalamuksen dorsomediaalisen tumakkeen ja preoptisen periventrikulaarisen tumakkeen sekä Barringtonin tumakkeen ja pontine tegmentumin dopamiinihermosoluista (Hoffman ym. 1998).

DAT:a ilmennetään lähes pelkästään dopamiinia vapauttavissa hermosoluissa, minkä takia sitä voidaankin pitää dopaminergisten hermosolujen spesifisenä merkkiaineena (Masson ym. 1999). Immunoelektronimikroskooppiset tutkimukset ovat osoittaneet DAT:n sijaitsevan muiden monoamiinitransportterien tapaan niin sanotulla perisynaptisella alueella synaptisen alueen ulkopuolella, minkä lisäksi sen tarkkaa sijaintia postsynaptisissa hermosoluissa on myös tutkittu (Ciliax ym. 1995; Hersch ym. 1997; Nirenberg ym. 1997). Varsinaisilta synaptisesti aktiivisilta alueilta DAT:a ei sen sijaan ole löydetty ainakaan striatumista, mikä viittaa siihen, että hermopäätteestä vapautuva dopamiini diffundoituu pois synapsiraosta ja sen kuljetus takaisin hermopäätteeseen tapahtuu pääasiassa aktiivisen alueen ulkopuolisten transportterien välityksellä (Hersch ym. 1997).

Substantia nigrassa DAT:a esiintyy kuitenkin sekä pre- että postsynaptisilla aktiivisilla alueilla sekä lisäksi erityisesti dendriiteissä, missä se sijaitsee sekä sileällä endoplasmisella kalvostolla että solukalvon pinnalla (Hersch ym. 1997). Striatumissa DAT on paikannettu laajalle alueelle aksonien ja aksonipäätteiden solukalvolle, missä se muodostaa symmetrisiä synapseja (Hersch ym. 1997). DAT:n on todettu myös

esiintyvän tyrosiinihydroksylaasin (TH) ja D2-reseptorin läheisyydessä (Hersch ym. 1997; Nirenberg ym. 1997).

Akkumbens-tumakkeessa DAT:n määrä vaihtelee ytimen ja kuoren välillä (Nirenberg ym. 1997). Rotan aivoleikkeissä kuoren DAT-immunoreaktiivisuus oli alhaisempi ja sen dopaminergisissä aksoneissa oli selvästi matalampi DAT-tiheys, millä on todennäköisesti vaikutusta herkkyydelle psykostimulantteja kohtaan (Nirenberg ym. 1997). Kuorikerros oli myös selvästi ydintä kestävämpi DAT:n kautta soluun pääsevien neurotoksiinien kuten 6-hydroksidopamiinin (6-OHDA) vaikutuksille (Zahm 1991).

*In situ* -hybridisaatiossa ja immunohistokemiallisissa kokeissa DAT:a on löydetty myös perifeerisistä kudoksista keskushermoston ulkopuolelta, vaikka suurin osa tutkimuksesta onkin keskittynyt aivojen alueelle (Amenta ym. 2001; Eisenhofer 2001). Ruoansulatuskanavassa DAT on sijoittunut laajalle alueelle dopamiinia tuottavien hermosolujen läheisyyteen (Eisenhofer ym. 1997). Dopamiini toimii kanavassa osana elimistön parakriinistä ja autokriinistä järjestelmää, ja sitä tuotetaan lähes kaikkialla sen osissa (Eisenhofer ym. 1997). DAT:a on löydetty lisäksi ainakin vatsan parietaali- ja endoteelisoluista, retinasta, munuaisista, lymfosyyteistä sekä haimasta (Amenta ym. 2001; Eisenhofer 2001). Haimassa se esiintyy haimatiehyiden solukalvoilla sekä laskimoiden, mutta ei valtimoiden, endoteelissä (Eisenhofer 2001).

### 3 DAT:N TOIMINTAMEKANISMI

Toimintamekanismitaan DAT on symportti ja se säätelee dopamiinin kuljetusta solukalvon lävitse elektrogeenisesti (Torres ym. 2003b). Kuljetus tapahtuu pitoisuuden vastaisesti pienemmästä pitoisuudesta suurempaan  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP:aasin luoman  $\text{Na}^+$ -konsentraatiogradientin avulla, mikä on ainoa kuljetuksen nopeutta ja suuntaa säätelevä tekijä. Transportterin toiminta edellyttää, että siihen sitoutuu peräkkäin kaksi  $\text{Na}^+$ -ionia ja yksi  $\text{Cl}^-$ -ioni (Gu ym. 1994). Tämä poikkeaa NET:stä ja SERT:stä, jotka molemmat vaativan substraattinsa kuljetukseen vain yhden  $\text{Na}^+$ - ja  $\text{Cl}^-$ -ionin sitoutumisen (Torres ym. 2003b).

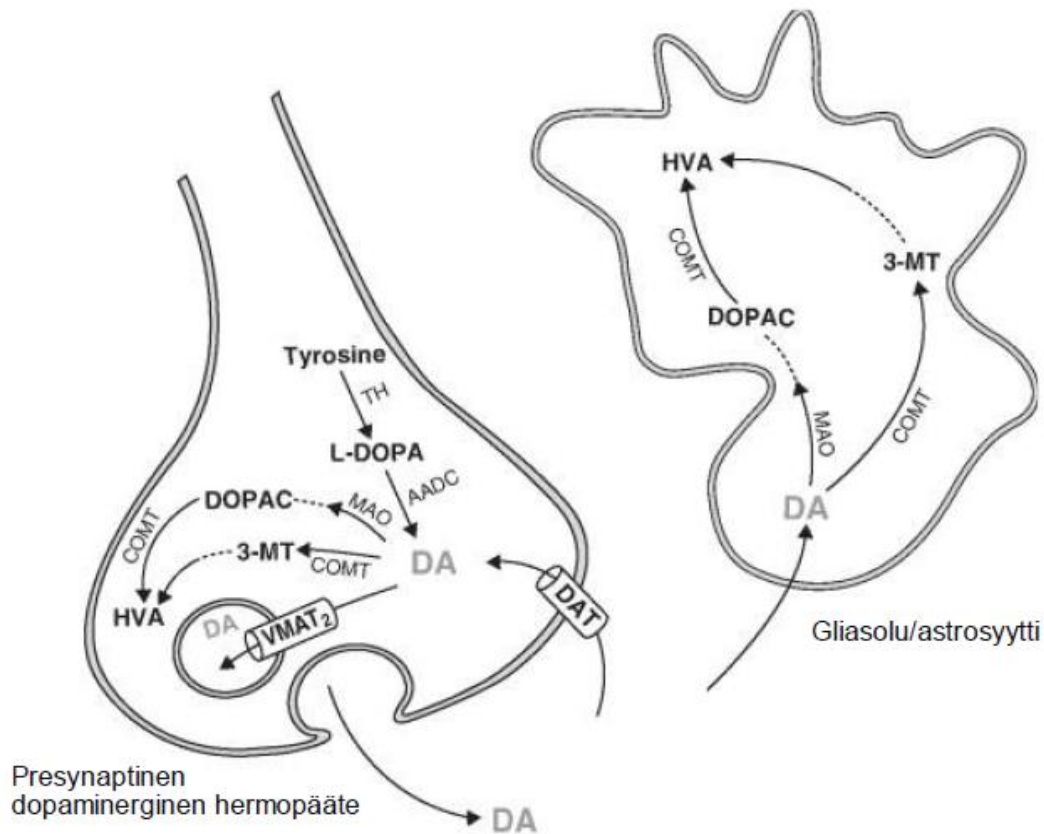
Transportterin toiminnan kannalta natriumin sitoutuminen on välttämätöntä (Chen ym. 2004). Kloridi-ionin rooli kuljetuksessa sen sijaan on epävarma. Sillä ei todennäköisesti ole merkitystä kuljetuksen energiansaannin kannalta, koska solujen lepopotentiaali on jo valmiiksi lähellä kloridin tasapainotilaa. Se saattaa kuitenkin lisätä natriumin affiniteettia transportteriin, vaikka se ei ilmeisesti vaikutakaan solukalvon läpi siirtyvän varauksen kokonaismäärään (Loo ym. 2000).

Natrium sitoutuu transportterin solunulkoiseen osaan (Gu ym. 1994). Dopamiinin sitoutuminen saa aikaan konformaatiomuutoksen, joka mahdollistaa sekä dopamiinin että natriumin vapautumisen solun sisäpuolella. Kuitenkin tietyissä farmakologisissa olosuhteissa, kuten amfetamiinin kaltaisten aineiden vaikutuksesta, transportterin toimintasuunnan kääntyminen on mahdollista (Fischer ja Cho 1979). Tällöin dopamiinin kuljetus tapahtuu solusta ulos. DAT:n tarkoitus ei kuitenkaan varsinaisesti ole dopamiinin poistaminen synapsiraosta, vaan ennemminkin dopamiinin vaikutuksen säätely ekstrasynaptisiin dopamiinireseptoreihin (Schmitt ja Reith 2010).

Dopamiinin lisäksi DAT pystyy kuljettamaan myös noradrenaliinia, vaikka kuljetuksen teho onkin huomattavasti NET:ä huonompi (Giros ym. 1992). Dopamiinin takaisinotto noradrenaliinitransportterin kautta on osoitettu niin *in vivo* -mikrodialyysillä kuin hiiren aivoleikkeilläkin (Morón ym. 2002; Yamamoto ja Novotney 2002). Vastaavasti myös NET kykenee sitomaan dopamiinin. Pääasiassa monoamiinit kuitenkin sitoutuvat ainoastaan omaan transportteriinsa,

DAT:n rooli on tärkeä erityisesti caudate putamenin alueella, missä se vastaa pääasiallisesti solunulkoisen dopamiinipitoisuuden säätelystä (Giros ym. 1996). Etuaivokuoren alueella DAT:n pitoisuus on sen sijaan matalampi kuin muissa keskushermoston osissa, minkä takia muiden mekanismien merkitys dopamiinin takaisinotossa korostuu (Morón ym. 2002). DAT- ja NET-poistogeenisillä hiirikannoilla tehdyssä kokeessa DAT-antagonistit kokaiini ja nisoksetiini estivät dopamiinin takaisinoton etuaivokuoressa ainoastaan DAT-poistogeenisillä, mutta ei NET-poistogeenisillä hiirillä, mikä viittaa noradrenaliinitransportterin merkitykseen dopamiinin takaisinotossa tällä alueella (Morón ym. 2002). NET:n lisäksi osa dopamiinista poistuu oletettavasti hermotukisolujen ja postsynaptisten hermopäätteiden solukalvolla sijaitsevan ns. takaisinotto II -mekanismin avulla (Samadi ym. 2007).

Tällöin joko katekoli-o-metyylitransferaasi (COMT) tai MAO metaboloivat dopamiinin edelleen 3-metoksityramiiniksi (3-MT) tai DOPAC:ksi, jotka puolestaan edelleen muutetaan HVA:ksi. Dopamiinin eri metaboliareitit on esitelty kuvassa 2.



Kuva 2: Dopaminerginen synapsi ja dopamiinin metabolia. Dopamiinitransportteri (DAT) ottaa suurimman osan vapautuneesta dopamiinista takaisin hermopäätteeseen, jossa joko katekoli-o-metyylitransferaasi (COMT) tai monoamiinioksidaasi (MAO) metaboloivat sen, tai se siirtyy varastorakkuloihin vesikulaarisen monoamiinitransportteri 2:n (VMAT2) kautta. Osa dopamiinista kuljetetaan myös takaisinotto II -mekanismilla ympäröiviin hermotukisoluihin tai astrozyytteihin, joissa MAO ja COMT metaboloivat sen edelleen 3,4-dihydroksifenyylietikkahapoksi (DOPAC) ja 3-metoksityramiiniksi (3-MT) sekä edelleen homovanilliinihapoksi (HVA) (Samadi ym. 2007).

Keskushermoston ulkopuolella ruoansulatuskanavassa ja haimassa sijaitsevan DAT:n merkityksen uskotaan liittyvän dopamiinin D5-reseptoriin (Mezey ym. 1999). D5-reseptorin vaikutukset kohdistuvat bikarbonaatin, hormonien sekä hapon eritykseen, immuunisolujen toimintaan ja limakalvojen verenvirtaukseen, ja rajoittamalla



reseptorille saatavilla olevan dopamiinin määrää, DAT saattaaakin osallistua myös näiden toimintojen ohjaukseen (Mezey ym. 1999). DAT-poistogeenisillä hiirillä tehdyissä kokeissa DAT:n puutos voimisti myös dopamiinin motiliteettia hidastavaa vaikutusta distaalisessa paksusuosuolessa (Walker ym. 2000).

Lymfosyyteissä sijaitseva DAT viittaa DAT:n mahdolliseen osallisuuteen immuuniteetissa (Gordon ja Barnes 2003). Niissä DAT:n tehtävänä on ottaa takaisin sympaattisista hermosoluista ja lymfosyyteistä vapautunut dopamiini ja säädellä näin sen vaikutusta B- T- ja NK-soluihin sekä mahdollisesti myös muihin imusoluihin. Lymfosyyttien DAT:n todellinen fysiologinen merkitys on kuitenkin epäselvä ja vaatii lisätutkimuksia esimerkiksi kudosspesifisillä DAT-poistogeenisillä hiirillä. Yksi mahdollisuus on, että lymfosyyteissä sijaitsevat transportterit mahdollistavat dopamiinipitoisuuden säätelyn koko elimistön alueella, sillä ne pääsevät nopeasti siirtymään kaikkialle, myös veri-aivoesteen läpi (Marazziti ym. 2010).

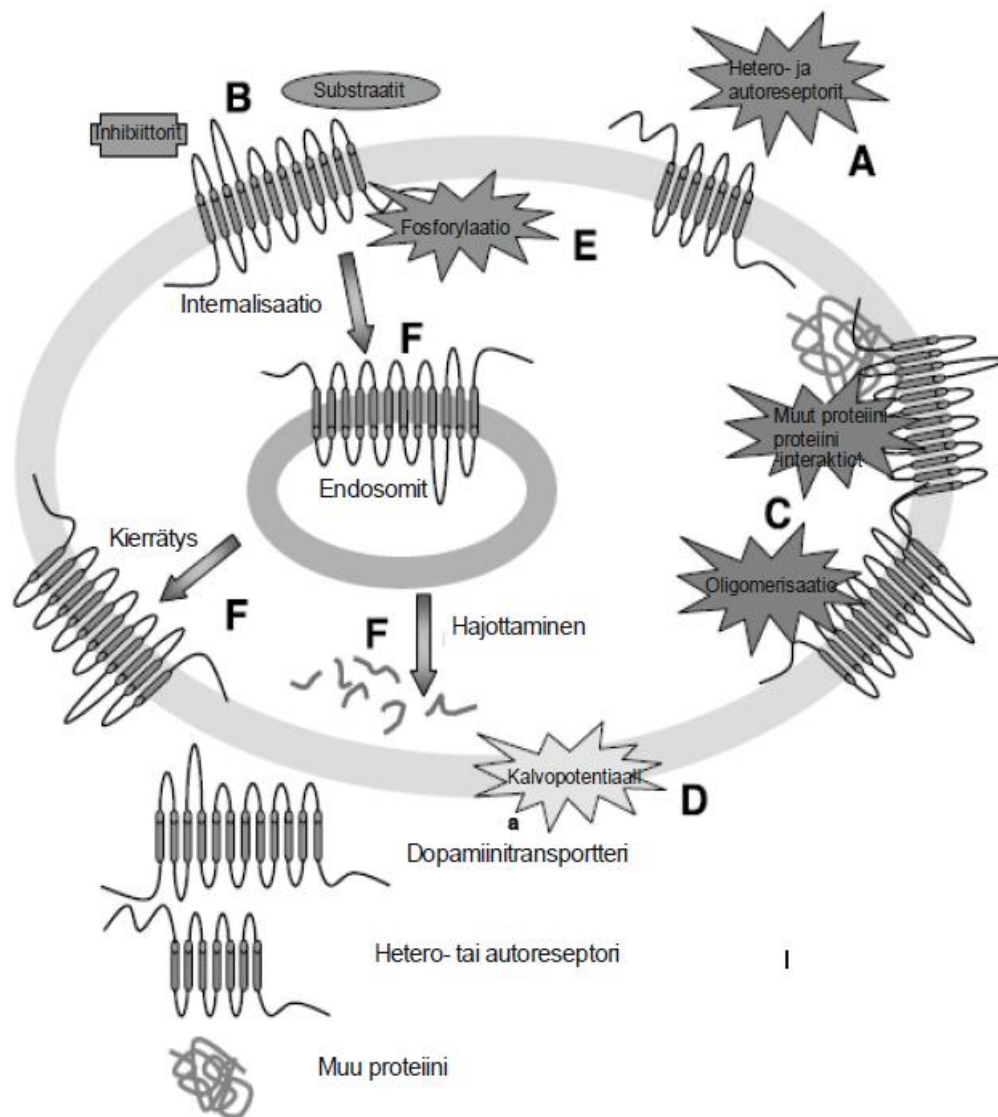
#### 4 DAT:N TOIMINNAN SÄÄTELY

Useat tärkeät fysiologiset prosessit kuten liikkeen säätely, toiminnan ohjaus, palkitseminen ja maidon erityy ovat riippuvaisia dopaminergisesta neurotransmissiosta (Jaber ym. 1997; Gether ym. 2006). Tästä johtuen dopamiinitransportterin toiminnan säätely on ensiarvoisen tärkeää elimistön normaalin toiminnan kannalta. DAT:n ilmentyminen onkin tarkoin kontrolloitua sekä pitkäaikaisesti geeniekspression että akuutisti translaation jälkeisen muokkauksen avulla (Mortensen ja Amara 2003). Toimintaan vaikuttaminen on mahdollista kaikissa transportterin elinkaaren vaiheissa, kuten geenin transkriptiossa, mRNA:n translaatiossa ja stabiliteetissa, solun pintaan kuljettamisessa sekä hajottamisessa. Se, mitkä solut ilmentävät DAT:a riippuu transkriptiotekijöistä, kun taas useat erilaiset fosfataasit ja proteiinikinaasit säätelevät DAT:n toimintaa sekä retentiota solukalvon pinnalla (Mortensen ja Amara 2003; Foster ym. 2003; Torres ym. 2003b; Fog ym. 2006). Muun muassa pidempiaikaiset muutokset dopamiinin määrässä, joko suoraan transportteriin tai siihen vaikuttaviin presynaptisiin

G-proteiinikytkentäisiin reseptoreihin sitoutuvat pienimolekyyliset ligandit, sekä useat eri lääkeaineet ja reseptorit voivat lisätä tai vähentää DAT:n määrää solukalvolla (Zahniser ja Doolen 2001). Ne vaikuttavat samalla myös maksimaaliseen nopeuteen, jolla dopamiinia voidaan poistaa synapsiraosta (Gether ym. 2006).

DAT:n pitkäaikaisessa säätelyssä keskeisessä roolissa ovat useat lääkeaineet (Zahniser ja Doolen 2001). Krooninen transportteriin sitoutuvan lääkeaineen, kuten kokaiinin, käyttö voi aiheuttaa kompensatorisia muutoksia aivoissa ja joko lisätä tai vähentää DAT:n ilmenemistä solukalvon pinnalla (tarkemmin kappaleessa 4). Toistuva monoamiinien hajoamista edistävän reserpiinin annostelu vähensi dopamiinin takaisinottoa 51 % rotan striatumkudoksessa (Gordon ym. 1996). Sen todettiin vähentävän DAT:n määrää, mutta toisaalta lisäävän affiniteettia dopamiinille mahdollistaen näin riittävän dopamiinin takaisinoton vähentyneistä sitoutumiskohdista huolimatta. Kerta-annoksella reserpiiniä ei sen sijaan ollut vaikutusta kumpaankaan, mikä kertoo pitkäaikaisen säätelyn merkityksestä.

Kokonaisuutena eri lääkeaineilla tehtyjen tutkimusten perusteella vaikuttaa siltä, että dopamiinin kynnysarvojen täytyy olla kohonneina pidemmän aikaa, jotta sillä olisi vaikutusta dopamiinitransportterin säätelyyn (Rocha 2003). Uuden DAT-proteiinin synteesi on myös varsin hidas prosessi, ainakin 2-3 päivää, eli proteiinisynteesiin vaikuttamalla ei ole mahdollista saada aikaan nopeita muutoksia (Schmitt ja Reith 2010). Myös pidempiä aikoja on raportoitu, sillä striatumiin injektiona annetun ei-kilpailevan DAT-estäjän antamisen jälkeen kesti 6 päivää, ennen kuin transportterin toiminta palautui jälleen normaaliksi (Fleckenstein ym. 1996). Striatumiin annettu injektio oli menetelmänä kuitenkin tavallista systeemistä annostelua invasiivisempi, mikä saattoi vaikuttaa tulokseen.



Kuva 3: Dopamiinitransportterin (DAT) toimintaa voidaan säädellä joko suoraan tai epäsuorasti useilla postranslationalisilla mekanismeilla. Niihin kuuluivat mm. DAT:n fosforylaatio, oligomerisaatio, muut proteiini-proteiini-interaktiot, internalisaatio solunsisäisiin osiin ja kierrätys takaisin solukalvolle, hajottaminen, sekä antagonistien tai agonistien vaikutus. (Mortensen ja Amara 2003)

Pitkäaikaisten säätelymekanismien hitauden takia tärkeimmässä asemassa transportterin säätelyssä ovatkin erilaiset post-translationaliset mekanismit, joiden avulla DAT:n toimintaan vaikuttaminen on mahdollista suoraan tai epäsuorasti sekuntien tai

minuuttien kuluessa ilman uuden proteiinin syntetisoimista tai transkriptiotason muutoksia (Zahniser ja Doolen 2001; Gulley ja Zahniser 2003). Mahdolliset mekanismit ovat esiteltynä kuvassa 2. Niihin lukeutuvat solunsisäisen signaalijärjestelmän aktivaatiosta seuraavat suorat fosforylaatioreaktiot, epäsuorat mekanismit eli kuljetusta säätelevien kemiallisten ja sähköisten gradienttien muuttaminen, internalisaatio, eli transportterin kuljetukseen ja sijoittumiseen vaikuttaminen plasmamembraanin ja solunsisäisten endosomaalisten osien välillä, homo- ja heteromonomeerien muodostuminen proteiini-proteiinini-interaktioiden avulla, sekä transportterin hajottaminen (Grånäs ym. 2003; Torres ym. 2003a; Mortensen ja Amara 2003). Internalisaation säätely on kuitenkin näistä mekanismeista pääasiallinen.

#### 4.1 Fosforylaatio, internalisaatio ja proteiinikinaasit

Useat eri proteiinikinaasit voivat säädellä DAT:n toimintaa suoralla fosforylaatiolla (Foster ym. 2003; Torres ym. 2003b; Fog ym. 2006). Tämä tapahtuu solukalvolla, johon dopamiinitransportterit valmistumisensa jälkeen kuljetetaan. Fosforylaatio on seurausta useiden eri kinaasien, kuten proteiinikinaasi C:n (PKC), mitogeenin aktivoimiin kinaaseihin (MAPK) kuuluvien solunulkoisen säätelyn alaisten proteiinikinaasien (ERK 1 ja 2) tai  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmoduulista riippuvien kinaasien (CaMKII) aktivaatiosta (Keith ym. 2012). Se voidaan aiheuttaa myös käsittelemällä soluja fosfataasijäillä, kuten okadapollilla. Fosforylaatio puolestaan johtaa jatkoreaktioihin ja DAT:n toiminnan muuttumiseen Fosforylaatio voi myös muokata kuljettajaproteiinien katalyyttistä nopeutta, siirtäen niiden affiniteettia substraattia tai inhibiittoria kohden (Mortensen ja Amara 2003). Tärkeimmät DAT:iin vaikuttavista proteiinikinaaseista, fosfataaseista sekä substraateista, antagonisteista ja reseptoreista on esitetty yhteenvetona taulukossa 1.

Taulukko 1: Yhteenveto tärkeimpien DAT:n säätelyyn osallistuvien kinaasien, fosfataasien ja reseptorien aktivaation tai inhibition vaikutuksesta DAT:n toimintaan

Säätelijä	Vaikutus DAT:in	Lähteet
<b>Proteiinikinaasit</b>		
<b>PKC</b>	Aktivaatio: DAT:n $V_{\max}$ ↓, määrä solukalvon pinnalla ↓, endosytoosi ja fosforylaatio ↑	(Zhu ym. 1997; Melikian ja Buckley 1999; Torres ym. 2003b)
<b>ERK1/2</b>	Inhibitio: DAT:n $V_{\max}$ ↓, määrä solukalvon pinnalla ↓	(Bolan ym. 2007)
<b>P13K</b>	Inhibitio: DAT:n $V_{\max}$ ↓, määrä solukalvon pinnalla ↓	(Carvelli ym. 2002)
<b>CaMKII</b>	Aktivaatio: Aminopäätteen fosforylaatio ↑, säätelee amfetamiinin aiheuttamaa DA-sisäänvirtausta	(Fog ym. 2006)
<b>Fosfataasit</b>		
<b>PP1</b>	Defosforylaatio ↑	(Foster ym. 2003)
<b>PP2A</b>	Muodostaa kompleksin DAT:n kanssa, inhibitio: DAT:n fosforylaatio ↑	(Bauman ym. 2000)
<b>Substraatit</b>		
<b>Dopamiini</b>	Vähentää DAT:n määrää solukalvon pinnalla	(Richards ja Zahniser 2009)
<b>Amfetamiini</b>	DAT:n määrää solukalvolla akuutisti ↑, pitkäaikaisesti ↓, DAT:n fosforylaatio ↑	(Sulzer ym. 2005; Goodwin ym. 2009; Richards ja Zahniser 2009)
<b>Antagonistit</b>		
<b>Kokaiini</b>	$V_{\max}$ ja ekspressio solukalvon pinnalla ↑	(Wilson ym. 1996; Little ym. 1999; Beveridge ym. 2009)
<b>Reseptorit</b>		
<b>D2-reseptori</b>	Aktivaatio: DAT:n määrä solukalvon pinnalla ↑	(Meiergerd ym. 1993; Lee ym. 2007; Bolan ym. 2007)
<b>D3-reseptori</b>	Vaikutus riippuu aktivaation kestosta: akuutisti DAT:n ekspressio ↑, jatkuvana DAT:n ekspressio ↓	(Zapata ym. 2007)

Solukalvolla forboli-12-myristaatti 13-asetaatin (PMA) indusoima PKC:n aktivaatio lisää DAT:n aminopäätteen fosforylaatiota dopamiinitransportterilla transfektoiduissa soluissa useilla eri solulinjoilla ja johtaa DAT:n aktiivisuuden merkittävään vähenemiseen (Copeland ym. 1996; Melikian ja Buckley 1999; Torres ym. 2003b). Heterologisissa soluissa tämä vaikutus perustuu lähinnä  $V_{\max}$ :in pienentymiseen, mikä viittaa aktiivisuuden vähentymisen johtuvan internalisaatiosta, eli transportterin kuljetuksesta solukalvon pinnalta takaisin sytoplasmaan, ei niinkään muutoksissa transportterin luontaisessa affiniteetissa substraattiin. Daniels ym. (1999) tutkimuksessa DAT:n solukalvolta soluun sisälle siirtymisen ehdotettiin olevan endosytoosia välittävän klatrinimolekyylin aikaansaamaa ja dynamiinista (GTPaasi) riippuvaista, sillä dynamiinin negatiivinen mutanttimuoto esti internalisaation täysin (Daniels ja Amara 1999). Tämän teorian mukaan endosytoosi on palautumatonta, ja endosytoidut transportterit kuljetetaan varhaisiin endosomeihin, missä ne hajotetaan lysosomaalisen reitin kautta. Transportterien päämäärä solun sisällä kuitenkin vaihtelee eri tutkimuksien välillä todennäköisesti eri tutkimusmenetelmistä ja käytetyistä solulinjoista johtuen, ja useat tutkimukset puoltavatkin transportterin internalisaation olevan kaksisuuntainen reaktio (Saunders ym. 2000). Ainakin teoriassa on siis mahdollista kierrättää transportterit takaisin solun pinnalle uudelleen käytettäviksi (Keith ym. 2012). Toistaiseksi ei kuitenkaan ole pystytty varmuudella selvittämään tapahtuuko tätä myös dopamiinitransportterilla, sillä uudet transportterit solun pinnalla saattavat olla peräisin myös solunsisäisistä varastoista kierrätyksen sijasta (Daniels ja Amara 1999). Ei myöskään ole varmaa vaatiiko transportterin internalisaatio solukalvolta aina fosforylaation, sillä tutkimuksissa joissa transportterilta oli poistettu kaikki PKC:n sitoutumiskohdat, ei sen indusoima internalisaatio kuitenkaan estynyt, vaikka fosforylaatiota ei tapahtunut (Grånäs ym. 2003).

Toinen teoria internalisaation säätelyssä on ubikitinaatio, joka on tärkeä askel DAT:n PKC:n aktivoimassa endosytoosissa (Hicke ja Dunn 2003; Miranda ym. 2005). Ubikitinaatiossa sytoplasmaan siirtyvä transportteri merkitään ubikitiini-säätelyproteiineilla. Ubikitinaatio on riippuvaista DAT:n aminopäätteen lysiineistä, ja mutaatio niissä estää reaktion johtaen DAT:n internalisaation vähenemiseen (Miranda

ym. 2007). PMA-stimulaation on myös osoitettu lisäävän ubikitinaatiota (Miranda ym. 2007).

Toisin kuin PKC:n, muiden DAT:n toimintaa säätelevien proteiinkinaasien, kuten proteiini kinaasi A:n (PKA), CaMKII:n, tyrosiinikinaaseihin kuuluvan fosfatidyliinositoli 3-kinaasi (PI3K), MAP-kinaasien ERK 1 ja 2:n, tarkat vaikutukset ovat vielä suurelta osin tuntemattomia (Carvelli ym. 2002; Torres ym. 2003b; Bolan ym. 2007).

Sekä PI3K-, ERK1/2- että MAPK-signaalireittien aktivaation on kuitenkin todettu lisäävän DAT:n kuljetuskapasiteettia ja ilmentymistä solukalvon pinnalla, eli vaikutus on päinvastainen PKC:en verrattuna (Carvelli ym. 2002; Morón ym. 2003). PI3K ja MAPK lisäävät myös DAT:n seriini- ja treoniinitähteiden fosforylaatiota (Carvelli ym. 2002). Akuutti PI3K-inhibiittori lisäsi lisäksi DAT:n internalisaatiota PKC:n tapaan klatriinista riippuvaisella mekanismilla, ja ERK1/2:n fosforylaation vähenemisen vaikutus DAT:in on samankaltainen: DAT:n internalisaation lisääminen ja  $V_{\max}$ :n väheneminen ilman että substraatin affiniteetissa tapahtuu muutoksia (Bolan ym. 2007).

PKA:n rooli on osin epäselvä (Copeland ym. 1996; Batchelor ja Schenk 1998). Sen voisi olettaa osallistuvan DAT:sta riippuvaiseen säätelyyn, koska D2-reseptori estää sen toimintaa adenylaattisyklaasin eston ja syklisen AMP:n tuotannon vähenemisen kautta (Zahniser ja Doolen 2001). Tästä huolimatta suurimmassa osassa tutkimuksia sen aktivaation ja DAT:n säätelyn välillä ei ole löytynyt yhteyttä (Copeland ym. 1996; Zhu ym. 1997). Kuitenkin on myös viitteitä siitä, että sen aktivaatio tehostaisi DAT:n toimintaa ja nopeuttaisi dopamiinin kuljetusta vaikuttamatta kuitenkaan proteiinin fosforylaatioon (Batchelor ja Schenk 1998).

Defosforylaatiolla on myös tärkeä merkitys transportterin toiminnassa, ja fosfataaseista erityisesti seriini/treoniini-fosfataaseihin kuuluvat proteiinifosfataasit 1/2A (PP1/PP2A) on yhdistetty DAT:n ja muiden monoamiinitransporttereiden aktiivisuuden säätelyyn (Bauman ym. 2000; Foster ym. 2003). Defosforylaatiota tapahtuu pääasiassa DAT:n aminopääteen seriinitähteissä, ja se vähentää transportterin toimintaa. Tämä on mahdollista estää laajakirjoisella proteiinifosfataasin estäjällä kuten okadapolla, joka lisäsi voimakkaasti DAT:n fosforylaatiota ja esti PP1:n toimintaa vaikuttamatta kuitenkaan PP2A:n rotan striatumkudoksessa (Foster ym. 2003). PP1 on myös *in vitro*

lisännyt DAT:n defosforylaatiota ja pystynyt defosforyloimaan sekä PKC-stimulaation vaikutuksesta metabolisesti fosforyloituneen rotan DAT:n että *in vitro* fosforyloidun DAT:n aminopäätteen (Foster ym. 2003). PP1:n toimintaa elimistössä säätelee kolme inhibiittoria, joista inhibiittori-1 esiintyy myös striatumissa (Hemmings ym. 1992). Inhibiittori-1:llä saattaakin olla rooli DAT:n epäsuorassa säätelyssä PP1:n fosforylaation kautta.

PP2A:n vaikutukset ovat samansuuntaisia PP1:n kanssa. PP2A voi reagoida DAT:n kanssa muodostaen kompleksin, mikä viittaa sen osallisuuteen DAT:n fosforylaation säätelyssä (Bauman ym. 2000). Ei kuitenkaan ole varmaa, onko interaktio suora proteiini-proteiini-interaktio, vai liittyykö siihen myös muita proteiineja.

#### 4.2 Dopamiinin D2- ja D3-autoreseptorit

Dopamiinin D2- ja D3-reseptorit kuuluvat D2-reseptorin kaltaiseen dopamiinireseptoriperheeseen (Missale ym. 1998). Ne sijaitsevat dopamiinihermosoluissa limbisillä aivoalueilla, joissa niiden vaikutus dopamiinin neurotransmission säätelyyn on hyvin tunnettu. D2-reseptori toimii sekä presynaptisena autoreseptorina että tavallisena postsynaptisena reseptorina, tai heteroreseptorina muissa soluissa. Solujen soomassa sijaitsevat reseptorit estävät impulssien laukaisua, ja D2-autoreseptorin aktivaatiolla on inhibitorinen vaikutus dopamiinin synteesiin ja vapautumiseen hermopäätteestä.

D2- ja D3-reseptorien roolia DAT:n säätelyssä on kuitenkin tutkittu vähemmän. D2-reseptorin stimulaation on tähän mennessä osoitettu nostavan nopeasti DAT-konsentraatiota solukalvolla virtaussytometrialla ja biotinulaatiokokeissa, joissa D2-reseptorin lyhyen muodon osoitettiin reagoivan DAT:n kanssa (Bolan ym. 2007). Yhteisvaikutuksen täydellinen mekanismi ja biologinen merkitys vaativat kuitenkin lisätutkimuksia. Yhdeksi vaihtoehdoksi on kuitenkin esitetty DAT:n aminopäätteen ja D2-reseptorin kolmannen solunsisäisen silmukan suoraa proteiini-proteiini-interaktiota, joka helpottaisi DAT:n kuljetusta solun sisäosista solukalvon pinnalle (Lee ym. 2007).



D2- ja D3-agonisti kinpiroli lisäsi myös dopamiinin takaisinottoa rotan striatumkudoksessa ja *in vitro* -voltammetrialla mitattuna (Meiergerd ym. 1993; Zapata ym. 2007). Lisäksi D3-agonisti PD128907 lisäsi transportterin toimintaa ja dopamiinin takaisinottoa hiiren akkumbens-tumakkeessa (Zapata ja Shippenberg 2002). D2-reseptorin antagonistilla haloperidolilla tulos oli odotetusti päinvastainen (Meiergerd ym. 1993). D3-reseptorin stimulaatio aktivoi myös MAPK:n ja PI3K:n, ja kumman tahansa kinaasin esto puolestaan kumosi kinpirolin vaikutuksen (Zapata ym. 2007). Samassa tutkimuksessa todettiin myös, että reseptorin aktivaation vaikutus DAT:n toimintaan on riippuvaista agonistialtistuksen kestosta. Lyhytkestoinen altistus lisäsi DAT:n aktiivisuutta ja määrää solukalvon pinnalla *in vitro* -soluviljelmissä, mutta jatkuvan altistuksen vaikutus oli päinvastainen.

#### 4.3 N-linkitetty glykosylaatio

Dopamiinitransportterissa ja muissa  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ -riippuvaisissa transporttereissa on paikka N-linkitetylle glykosylaatiolle toisessa solunulkoisessa silmukassa (Torres ym. 2003a). N-linkitetyssä glykosylaatioissa DAT:n aminopääteen typpi-atomiin liitetään sokerimolekyyli. NET:n stabiliteetti ja kuljetus ovat siitä riippuvaisia ja aikaisemmin sen uskottiin vaikuttavan myös DAT:n toiminnan säätelyyn (Melikian ym. 1996; Lin ym. 1999). Uudemmissa tutkimuksissa N-linkitetyllä glykosylaatiolla ei ole kuitenkaan osoitettu olevan suurta merkitystä transportterin kuljetukseen tai ligandin sitomiseen ja sillä onkin todennäköisesti tärkeä merkitys vain transportterin stabiliteetin kannalta (Torres ym. 2003a; Li ym. 2004).

#### 4.4 Jännitteestä riippuvainen säätely

Kuljetus solukalvon läpi edellyttää varauksellisten substraattien ja ionien elektrogeenistä liikettä. Muutoksilla tässä kalvopotentiaalissa on mahdollista säädellä kuljetuksen määrää (Sonders ym. 1997). Kynsisammakon oosyyteillä tehdyssä

tutkimuksessa havaittiin, että kuljetus kasvaa solun ollessa hyperpolarisoitunut, ja laskee depolarisaation myötä. Toisaalta useissa uudemmissa tutkimuksissa on saatu myös eriäviä tuloksia (Prasad ja Amara 2001). Tutkimuksessa, jossa mitattiin dopamiinin aiheuttamaa solukalvon hyperpolarisaatiota, ei havaittu muutoksia dopamiinin takaisinotossa, kun hyperpolarisaatio estettiin D2-antagonistilla raklopridilla (Prasad ja Amara 2001). Tulosten perusteella aktiopotentiaalit tai muutokset kalvojäännitteessä eivät pysty vaikuttamaan DAT:n toimintaan.

#### 4.5 Proteiini-proteiini-interaktiot

Useilla eri proteiineilla on havaittu interaktioita DAT:n eri osien kanssa (Wersinger ja Sidhu 2003). Lisäksi DAT voi muodostaa oligomeerejä myös itsensä kanssa (Torres ym. 2003a). Yhdessä nämä löydökset viittaavat siihen, että DAT:n säätelyä ja toimintaa voidaan muokata myös vaikuttamalla oligomerisaatioon tai DAT:iin sitoutuvien proteiinien toimintaan.

Suurin osa interaktioista on löydetty käyttämällä hiivan kaksihybridi-menetelmää (Y2H), jonka avulla voidaan tutkia proteiinien välisiä vaikutuksia. Tähän mennessä ainakin tumareseptoriin liittyvän proteiinin 1 (NURR1),  $\alpha$ -synukleiinin, transformoivan kasvutekijä  $\beta$ -1-indusoidun transkriptioproteiini 1:n (TGFB1|1), aktivoidun C-kinaasin 1-proteiinin (RACK1), fokaalisen adheesioproteiinin (Hic-5), syntaksiinin, CaMKII:n ja PKC:n sitoutuvan  $\alpha$ -proteiinin (PICK1) tiedetään pystyvän sitoutumaan DAT:n eri osien kanssa (Wersinger ja Sidhu 2003; Lee ym. 2004; Swant ym. 2011).

DAT:n oligomerisaatio on osoitettu ihmisen dopamiinitransportteria ilmentävissä HEK-293-soluissa (Torres ym. 2003a). Useiden solukalvon läpäisevien osien yhteisvaikutus on todennäköisesti edellytys oligomeerikompleksien muodostumiselle ja solukalvon pintaan kuljettamiselle. Oligomerisaatioon kykenemättömillä muokatuilla transporttereilla tehdyssä tutkimuksessa transportterit jäivät endoplasmiseen kalvostoon solukalvolle siirtymisen sijasta (Sorkina ym. 2003). Hastrup ym. (2003) tutkimuksessa saatiin lisäksi viitteitä ainakin transportterin solukalvon läpäisevien osien neljä ja kuusi

osallistumisesta reaktioon (Hastrup ym. 2003). Oligomerisaatio voi todennäköisesti joko lisätä DAT:n aktiivisuutta tai stabiliteettia (Torres ym. 2003a).

NURR1 kuuluu hormonireseptorien suurperheeseen, ja sitä esiintyy pääasiassa keskiaivoissa dopaminergisillä alueilla (Sacchetti ym. 2001). Sen on todettu lisäävän epäsuoran mekanismin kautta ihmisen DAT- ja TH-geenien transkriptiota sekä suojaavan dopamiinihermosoluja MPTP:n aiheuttamilta vaurioilta (Sacchetti ym. 1999; Sakurada ym. 1999). Sillä on merkittävä rooli dopaminergisessä säätelyssä, mutta sen toimintaa ohjaavat mekanismit ja signaalireitit ovat vielä osin epäselviä (Sacchetti ym. 2006). NURR1:llä on kuitenkin todettu interaktioita ainakin retioidi X (RXR) -reseptorin sekä kinaasien ERK2, LIMK1 ja MEK5/ERK5 kanssa (Sacchetti ym. 2006).

$\alpha$ -synukleiini on 140 aminohaposta koostuva proteiini, joka on yhdistetty useisiin neurodegeneratiivisiin sairauksiin (Swan ym. 2011). Se muodostaa tiiviin kompleksin DAT:n kanssa suoran proteiini-proteiini-interaktion välityksellä sitoutumalla DAT:n C-terminaaliosaan (Lee ym. 2001; Wersinger ja Sidhu 2003). Tutkimukset  $\alpha$ -synukleiiniin ja DAT:n välisen interaktion seurauksista ovat kuitenkin osin ristiriitaisia.  $\alpha$ -synukleiinin yli-ilmentymisen on tutkimuksesta riippuen todettu joko lisäävän DAT:n aktiivisuutta ja määrää solukalvolla tai päinvastaisesti vähentävän sitä (Lee ym. 2001; Wersinger ym. 2003).  $\alpha$ -synukleiinin läsnäolo lisää myös MPP<sup>+</sup>:n DAT-välitteistä toksisuutta (Torres ym. 2003b).  $\alpha$ -synukleiinin poistaminen sen sijaan nosti dopamiinin pitoisuutta ja vastaavasti vähensi DAT:n ilmentymistä ja takaisinottoa dorsaalissa striatumissa  $\alpha$ -synukleiini-poistogeenisillä hiirillä (Chadchankar ym. 2011).

PICK1-interaktio lisää dopamiinitransportterin aktiivisuutta stabiloimalla sen solun pinnalle (Torres ym. 2001). Se reagoi transportterin karboksyyliipäätteen kanssa ja indusoi DAT:n pakkautumista transfektoituihin soluihin lisäten DAT:n aktiivisuutta sekä hermo- että lisäsoluissa (Torres ym. 2001). Tämä saattaa viitata PICK1:n osallisuuteen myös DAT:n kohdentamisessa hermopäätteisiin. Hermosoluviljelmissä tehdyissä kokeissa, jossa käytettiin transportteria, josta oli poistettu PICK1:n sitoutumiskohta, jäi DAT lähinnä hermosolun soomaosaan eikä osallistunut dopamiinin takaisinottoon solukalvon pinnalla (Torres ym. 2001).

Hic-5 on adaptoriproteiinien fokaaliseen adheesioperheeseen kuuluva proteiini, joka osallistuu solujen selviytymiseen, vaeltamiseen, kasvuun ja erilaistumiseen (Thomas ym. 1999). Keskushermostossa Hic-5 esiintyy striatumissa, aivokuorella, hippokampuksessa ja pikkuaivoissa. Se reagoi DAT:n kanssa *in vivo* ja *in vitro* ja vähentää dopamiinin takaisinottoa ja DAT:n määrää solukalvolla (Tian ym. 2012). Koska Hic-5:n on osoitettu reagoivat myös useiden muiden signaalivälitysreittien kuten glukokortikoidireseptorin ja ei-reseptori tyrosiinikinaasien FAK:n (fokaalinen adheesiokinaasi) ja Fyn:in kanssa, on mahdollista että se toimii linkkinä DAT:n ja muiden solunsisäisten viestireittien välillä (Carneiro ym. 2002).

#### 4.6 Muut yhdisteet ja reseptorit

Myös useiden muiden aineiden ja reseptorien on todettu vaikuttavan DAT:n toimintaan ja sen nopeaan säätelyyn. Tällaisia ovat muun muassa arakidonihappo, etanoli, typpioksidi ja melittiini, sekä  $\kappa$ -opioidireseptori (Ingram ja Amara 2000; Thompson ym. 2000; Mayfield ym. 2001; Keith ym. 2012).

Etanolin on pitkään tiedetty lisäävän dopamiinin vapautumista hermopäätteestä, mutta uudemmissa *in vitro* -kokeissa sen on todettu vaikuttavan myös dopamiinitransportteriin (Mayfield ym. 2001; Methner ja Mayfield 2010). Etanoli lisäsi dopamiinin takaisinottoa DAT:a ilmentävissä kynsisammakon oosyyteissä ja HEK-293-solulinjassa, mutta *in vivo* -kokeissa tulokset ovat olleet erittäin vaihtelevia. Sekä krooninen että akuutti alkoholin annostelu on tutkimuksesta riippuen joko lisännyt, vähentänyt tai ollut kokonaan vaikuttamatta DAT:n aktiivisuuteen rotilla tehdyissä kokeissa (Yoshimoto ym. 2000; Rothblat ym. 2001; Robinson ym. 2005).

Tutkimuksessa, jossa akuutti altistuminen etanolille lisäsi dopamiinin takaisinottoa HEK-293-soluilla, perustui vaikutus DAT:n määrän lisääntymiseen solukalvon pinnalla (Methner ja Mayfield 2010). Transportterin affiniteetti dopamiinille ei kuitenkaan muuttunut. Syyksi on ehdotettu DAT:n glysiini-130- ja isoleusiini-137-aminohappotähteitä, sillä tutkimuksessa, jossa nämä korvattiin NET:n vastaavilla, ei

transportteri ollut enää herkkä etanolille (Maiya ym. 2002). Tällä hetkellä ei kuitenkaan tiedetä, vaikuttaako etanoli suoraan transportteriin.

Melittiini on DAT:iin sitoutuva 26 aminohaposta koostuva amfifiilinen peptidi, joka on eristetty mehiläisestä (Keith ym. 2012). Sen on todettu estävän dopamiinin takaisinottoa ja lisäävän DAT:n internalisaatiota dopamiinitransportteria ilmentävässä ihmisen HEK-D2-solulinjassa. Internalisaatio voidaan estää kokaiinilla. Melittiini myös estää antagonistin sitoutumisen transportteriin ja vapauttaa solukalvon fosfolipideistä arakidonihappoa, jolla on myös DAT:n toimintaa säätelevä vaikutus (Keith ym. 2010).

Arakidonihapon ja muiden monityydyttymättömien rasvahappojen on osoitettu muokkaavan ionikanavien ja transporttereiden toimintaa sekä suoraan että toisiolähtetien välityksellä (Ordway ym. 1989; Attwell ym. 1993). Arakidonihapolla saattaa olla vastaava vaikutus myös DAT:iin (Ingram ja Amara 2000). Se indusoi dopamiinin aiheuttamia kationivirtoja kynsisammakon oosyyteillä tehdyssä tutkimuksessa todennäköisesti sitoutumalla suoraan transportteriin (Ingram ja Amara 2000). Vaikutus voidaan kumota esikäsitlemällä solut DAT-estäjällä kokaiinilla. Lisäksi arakidonihapon metaboliaa estävät aineet vähensivät DAT:n toimintaa rotan striatumleikkeissä ja synaptosomeissa (Cass ym. 1991). Rotan gliomasoluissa lyhyt altistus arakidonihapolle puolestaan lisäsi dopamiinin takaisinottoa pitkän käsittelyn vaikutuksen ollessa päinvastainen (Zhang ja Reith 1996). Myös muilla rasvahapoilla on arakidonihapon kaltaisia ominaisuuksia tyydyttymättömien rasvahappojen ollessa tehokkaimpia, ja monityydyttymättömillä rasvahapoilla saattaakin olla suora vaikutus DAT:n toimintaan (Ingram ja Amara 2000).

Kardiovaskulaaristen vaikutustensa lisäksi typpioksidin on todettu osallistuvan sekä dopaminergisen, noradergisen että serotonergisen neurotransmission säätelyyn (Kiss 2000). Vaikutukset välittyvät usean eri mekanismin avulla, ja tutkimuksesta riippuen typpioksidi joko lisää tai estää dopamiinin vapautumista (Lorrain ja Hull 1993; Djamgoz ym. 1995; Kiss ym. 2004). Syyksi on ehdotettu ainakin DAT-estoa sekä epäsuoria vaikutuksia, jotka välittyvät joko guanylyylisyklaasin aktivaation tai paikallisten glutamaattitasojen nousun kautta (Kiss 2000; West ja Grace 2000; Kiss ym. 2004; David ym. 2005).

Kiinnostus  $\kappa$ -opioidireseptoria kohtaan sen sijaan perustuu havaintoon, että  $\kappa$ -opioidiagonistit säätelevät kokaiinin aiheuttamaa voimakasta solunulkoisen dopamiinipitoisuuden nousua. Akuutti  $\kappa$ -agonistin U69593 annostelu lisäsi dopamiinin takaisinottoa (Thompson ym. 2000). Kroonisesti käytettynä vaikutus oli samassa tutkimuksessa päinvastainen takaisinoton vähentyessä DAT:n määrän laskiessa solukalvolla sen kokonaismäärän kuitenkin muuttumatta.

## 5 DAT:N FARMAKOLOGIA

DAT on useiden erityisesti keskushermostoon vaikuttavien lääkeaineiden kohdemolekyylä (Zahniser ja Sorkin 2004). Monien nykyisten niin viihteelliseen kuin lääketieteelliseenkin käyttöön tarkoitettujen psykotrooppisten yhdisteiden kuten psykostimulanttien, masennuslääkkeiden sekä neurotoksiinien vaikutus välittyy ainakin osaksi dopamiinitransportterin kautta. Monet näistä aineista sitoutuvat transportteriin kilpaillen siinä dopamiinin kanssa. Osa sen sijaan toimii DAT:n suorana antagonistina ja estää dopamiinin takaisinottoa. Molempiin ryhmiin kuuluvat aineet kuitenkin lisäävät dopaminergista neurotransmissiota muokkaamalla DAT:n normaalia toimintaa. Lisäksi tunnetaan joitakin DAT-agonisteja, joiden vaikutus on päinvastainen, DAT:n toimintaa lisäävä (Zahniser ym. 1999; Zhang ym. 2010).

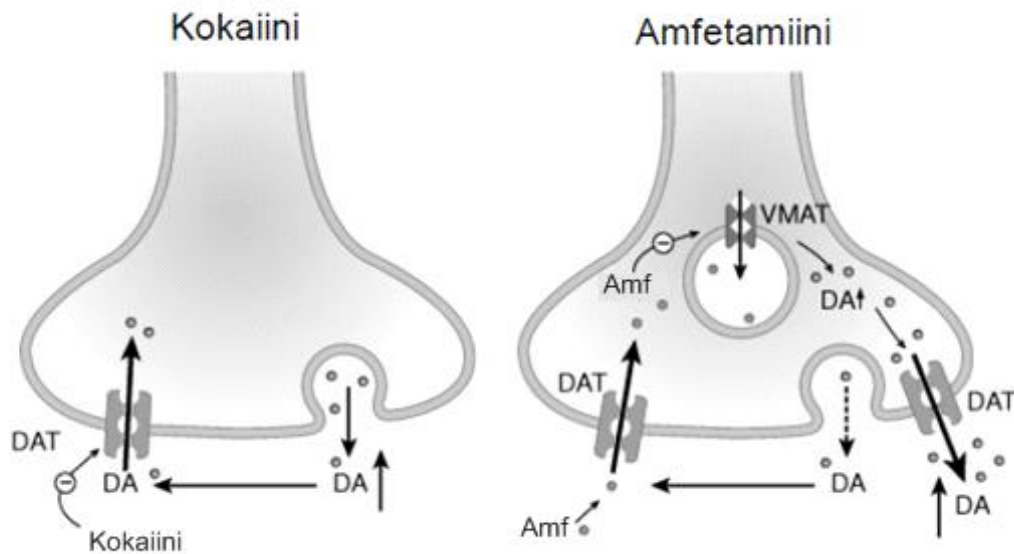
### 5.1 Antagonistit

Dopamiinitransportterin antagonistit sitoutuvat transportteriin estäen vapautuneen dopamiinin takaisinottoa tehokkuudella, joka riippuu niiden puoliintumisajasta ja affiniteetista transportteriin (Zahniser ja Sorkin 2004).

Kokaiini on klassinen ei-selektiivinen DAT-, SERT- ja NET-inhibiittori, jota on tutkittu paljon (Schmitt ja Reith 2010). Kokaiini estää dopamiinitransportterin toimintaa ja dopamiinin takaisinottoa suoraan transportteriin sitoutumalla (Kuva 4). Tästä johtuen

dopamiinin pitoisuus soluvälitilassa kasvaa. Kokaiinin on myös osoitettu muokkaavan DAT:n kuljetusta ja lisäävän sen määrää nopeasti solukalvon pinnalla rotan striatumissa ja ihmisen DAT:a ilmentävissä HEK-293-soluissa yhden annostelukerran jälkeen (Daws ym. 2002). Kroonisella kokaiinin tai metyylifenidaatin annostelulla on saatu ristiriitaisempia tuloksia, vaikka ne pääsääntöisesti kuitenkin näyttävät lisäävän DAT:n ilmentymistä joistakin eriävistä tuloksista huolimatta (Wilson ym. 1996; Little ym. 1999; Mash ym. 2002; Beveridge ym. 2009). Lisääntynyt ilmentyminen on pysytty osoittamaan muun muassa reesusapinoilla sekä analysoimalla kuolleiden kokaiiniriippuvaisten ihmisten aivoja (Little ym. 1999; Beveridge ym. 2009). Apinoilla vaikutus DAT:iin oli nähtävissä vielä 30 päivää annostelun lopettamisen jälkeen (Beveridge ym. 2009).

DAT:n ohella kokaiinilla on vastaava vaikutus ja affiniteetti myös noradrenaliini- ja serotoniinitransporttereihin (Uhl ym. 1996). Sen palkitsevat vaikutukset välittyvät kuitenkin todennäköisesti pääasiassa nimenomaan DAT-eston kautta, vaikka myös muiden transportterien osallisuudesta on viitteitä (Ritz ym. 1987; Uhl ym. 1996; Tilley ym. 2007). Kokaiinin sitoutumiskohdasta DAT:ssa ei kuitenkaan ole täyttä varmuutta, mutta sen oletetaan sitoutuvat transportterin sekundaariseen sitoutumistaskuun, eli eri kohtaan dopamiinin kanssa (Merchant ja Madura 2012).



Kuva 4: Amfetamiinin ja kokaiinin vaikutus hermopääteestä vapautuvan dopamiinin takaisinottoon dopaminergisessa hermosolussa yksinkertaistettuna. Dopamiini toimii DAT-inhibiittorina lisäten solunulkoista dopamiinikonsentraatiota. Amfetamiini lisää dopamiinin vapautumista käänteiskuljetuksen avulla. DAT=dopamiinitransportteri, DA=dopamiini, Amf=amfetamiini, VMAT=vesikulaarinen monoamiinitransportteri (Katzung ym. 2009)

Kokaiinin lisäksi muita samankaltaisia lääkeaineita, jotka estävät DAT:n toimintaa ilman kokaiinin riippuvuutta ja väärinkäyttöä aiheuttavaa vaikutusta, on tutkittu vain vähän (Torres ym. 2003b).

Kokaiinianalogit GBR 12935 ja WIN 35,428 ovat selektiivisiä DAT-estäjiä (Zahniser ym. 1999). Epäselektiivisiin estäjiin kuuluvat psykostimulantit metyyllifenidaatti ja matsindoli, sekä trisykliset masennuslääkkeet nomifensiini ja bupropioni ja muskariinireseptorin antagonisti bentstropiini.

## 5.2 Substraatit

Dopamiinitransportterin luonnollisen substraatin eli dopamiinin lisäksi tunnetaan myös lukuisa joukko muita transportteriin sitoutuvia molekyylejä, jotka joko vähentävät tai



lisäävät sen toimintaa. Tällaisia ovat muun muassa psykostimulantit d-amfetamiini ja sen johdannaiset d-metamfetamiini (METH) ja 3,4-metyleenidioksimetamfetamiini (MDMA, ekstaasi), metkatinoni, sekä endogeeniset amiinit kuten tyramiini ja  $\beta$ -fenetyyliamiini (Metzger ym. 1998; Fleckenstein ym. 1999).

Amfetamiini on näistä kuitenkin parhaiten tunnettu. Se on DAT:n kilpaileva substraatti, joka pääsee dopamiinihermosoluun sisään DAT:n ja/tai passiivisen diffuusion avulla (Sulzer ym. 2005). Se lisää solunulkoisen dopamiinin määrää mekanismilla, joka ei ole täysin tunnettu, mutta sen vaikutus eroaa joka tapauksessa merkittävästi kokaiinista, sillä toisin kuin kokaiini, amfetamiini ei kokonaan estä DAT:n toimintaa. Sen toimintamekanismiin liittyvistä teorioista eniten kannatusta on saanut käänteiskuljetus (Kuva 4). Käänteiskuljetuksen helpotetun diffuusion mallin mukaan dopamiinin vapautuminen on seurausta solun sisään joutuneesta amfetamiinista, joka lisää dopamiinin vapautumista solunsisäisistä varastoista (Fischer ja Cho 1979; Burnette ym. 1996). Teorian mukaan amfetamiini vaikuttaa pääasiassa solukalvon DAT:n solunulkoiseen osaan lisäten näin soluun sisäänpäin kääntyneen transportterin määrää. Tämä lisää käänteiskuljetusta ja vähentää dopamiinin konsentraatiota sytoplasmassa.

Toinen käänteiskuljetuksen teoria on ns. heikko emäs -malli (Sulzer ym. 1993; Sulzer ym. 1995). Siinä hermosolun sisällä amfetamiini, amfifiilinen heikko emäs, sitoutuu dopamiinia sisältävien varastorakkuloiden, VMAT2:n, pinnalle ja vähentää pH-gradienttia, joka tuo energiaa neurotransmittereiden kertymiseen. Sitoutuminen tyhjentää VMAT2:n ylläpitämät dopamiinivarastot sytoplasmaan ja johtaa dopamiinipitoisuuden kasvuun solun sisällä. Tämä lisää käänteiskuljetukseen saatavilla olevan dopamiinin määrää ilman amfetamiinin ja DAT:n suoraa interaktiota.

Amfetamiinin sitoutuminen dopamiinitransportteriin vähentää myös transportterin aktiivisuutta pienentämällä sen kuljetuskapasiteettia ja pitoisuutta solukalvon pinnalla internalisaatioon perustuen *in vitro* -tutkimuksiin useilla eri solulinjoilla (Saunders ym. 2000; Gulley ym. 2002). Akuutisti annosteltuna amfetamiini vähensi dopamiinin takaisinoton  $V_{\max}$ -arvoa sekä lisäsi transportterin internalisaatiota sekä ihmisperäisessä solulinjassa että mikroskoopilla tarkasteltuna (Saunders ym. 2000). Internalisaatio on mahdollista estää annostelemalla samanaikaisesti DAT-estäjää kokaiinia, nomifensiiniä

tai matsindolia, tai vaihtoehtoisesti insuliinia, joka aktivoi dopamiinin takaisinottoa lisäävää PI3K:ta (Saunders ym. 2000; Carvelli ym. 2002).

Internalisaatio ei kuitenkaan ole tyypillistä pelkästään amfetamiinille, sillä myös muut DAT:n substraattina toimivat yhdisteet, myös dopamiini, aiheuttavat sitä (Saunders ym. 2000). Amfetamiinin vaikutus on kuitenkin voimakas. Koska vaikutus solukalvolla sijaitsevaan DAT:iin on myös päinvastainen kokaiinin kanssa, on amfetamiinin potentiaalia tutkittu kokaiiniriippuvuuden hoidossa.

D-metamfetamiinin vaikutus DAT:iin poikkeaa jonkin verran amfetamiinista (Goodwin ym. 2009). Sen vaikutus DAT:iin näyttää olevan amfetamiinia voimakkaampi, mikä korreloi sen euforiaa ja addiktiota aiheuttavien ominaisuuksien kanssa. *In vitro* metamfetamiini lisäsi dopamiinin vapautumista viisinkertaisesti amfetamiiniin verrattuna (Goodwin ym. 2009). Striatumissa aineiden välillä ei sen sijaan ollut eroa dopamiinin vapautumisessa tai eliminaatiossa rotilla *in vivo* -voltammeriassa, mutta etuaivokuorella metamfetamiinin aiheuttama vaste oli voimakkaampi johtaen suurentuneeseen solunulkoiseen dopamiinipitoisuuteen..

Amfetamiinin kaltaisista yhdisteistä suurin osa pystyy sitoutumaan myös muihin transporttereihin, ja vain muutaman tiedetään olevan selektiivinen DAT:lle (Torres ym. 2003b). Parkinsonin tautia sekä eläimillä että ihmisillä aiheuttava hermotoksiini 1-metyyli-4-fenyyli-1,2,3,6-tetrahydropriniidi (MPTP) on yksi näistä. Sen pääasiallinen metaboliitti keskushermostossa, 1-metyyli-4-fenyylipriniidi-ioni ( $\text{MPP}^+$ ), pääsee dopamiinihermosoluihin DAT:n välityksellä (Javitch ym. 1985; Gainetdinov ym. 1997). DAT-poistogeenisillä hiirillä hermotoksista vaikutusta ei havaita, mikä osoittaa DAT:n olevan välttämätön vaikutuksen ilmenemisen kannalta (Gainetdinov ym. 1997).

### 5.3 Agonistit

Kliinisessä käytössä ei ole tällä hetkellä yhtään dopamiinitransportterin agonistia (Zhang ym. 2010; Zhao ym. 2010). Niitä voitaisiin kuitenkin käyttää lievittämään neurologisissa sairauksissa dopamiinin korostuneen vaikutuksen aiheuttamia ongelmia,

sillä ne vahvistavat dopamiinin takaisinottoa ja vähentävät näin dopamiinin määrää soluvälitilassa.

Useita DAT:n toimintaa vahvistavia aineita on silti tutkittu (Zahniser ym. 1999; Zhang ym. 2010). Kaksi kasvipäristä fenolista flavonoidia, luteoliini ja apigeniini osoittautuivat DAT:n aktivaattoreiksi kiinan hamsterin munasoluilla ja dopaminergisilla solulinjoilla tehdyissä tutkimuksissa. Molemmat vaikuttavat myös muihin monoamiinitransporttereihin, mutta niiden affiniteetti DAT:iin on suurin. Luteoliinin sitoutuminen on vahvempaa, ja se osoittautui apigeniinia potentimmaksi DAT-agonistiksi.

## 6 DAT:N JA SEN POLYMORFIOIDEN MERKITYS SAIRAUKSISSA

DAT-proteiinin määrän vaihtelu on tavallista terveissäkin ihmisissä tietyllä vaihteluvälillä erityisesti iän perusteella (Volkow ym. 1996). Merkittävästi lisääntynyt tai vähentynyt DAT-aktiivisuus on kuitenkin yhdistetty myös useisiin neurologisiin ja psykiatrisiin sairauksiin, kuten masennukseen, Parkinsonin tautiin, skitsofreniaan, ADHD:en, Touretten syndroomaan ja huumeaddiktioon (Robbins ja Everitt 1999; Müller-Vahl ym. 2000; Dunlop ja Nemeroff 2007; Cilia ym. 2010; Fusar-Poli ym. 2012). Keskushermoston ulkopuolella sijaitsevan DAT:n mahdollinen merkitys sairauksissa tunnetaan sen sijaan huonommin.

DAT:ssa on todennäköisesti vain vähän säännöllistä suoraan sen proteiinirakenteeseen vaikuttavaa polymorfiaa, kuten ei-synonyymisiä yhden nukleotidin polymorfioita, joissa yksi aminohappo korvaantuu toisella (Fuke ym. 2001; Hahn ja Blakely 2002; Miller ja Madras 2002). DAT-geenille on kuitenkin löydetty useita koodaavia ja ei-koodavia säätelyyn vaikuttavia polymorfisia muotoja, joiden vaikutus kohdistuu proteiinin transkriptioon, translaatioon ja mRNA:n muokkaukseen. Niiden uskotaan altistavan useille neurologisille sairauksille ja taipumukseen riippuvuuden kehittymiselle. Tutkimukset aiheesta ovat kuitenkin osin ristiriidassa keskenään, eikä polymorfioiden lopullisesta merkityksestä ole täyttä varmuutta.

Eniten mielenkiintoa DAT:n polymorfioista ovat kuitenkin herättäneet erityisesti vaihtelevasta määrästä DNA-toistoja koostuvat polymorfiset satelliitti-DNA:t. Tällä hetkellä niistä tunnetaan 40 emäsparin pituinen jakso DAT-geenin 3'-päässä ei-koodattavassa osassa. (Hahn ja Blakely 2002; Miller ja Madras 2002; Xu ja Lin 2011). Koska polymorfia sijaitsee DAT:n avoimen lukukehyksen ulkopuolella, ei se vaikuta proteiinin rakenteeseen, mutta voi kuitenkin lisätä tai vähentää sen ilmentymistä vaikuttamalla mRNA:n rakenteeseen ja hajottamiseen (Fuke ym. 2001). 40 emäsparin toistojen määrä vaihtelee normaalissa väestössä 3 ja 11 välillä, 9 ja 10 toistojen ollessa yleisimmät. Pisimmillä toistoilla on suurin merkitys geenin ilmentymisessä, sillä niissä on eniten sitoutumiskohtia transkriptiotekijöille (Hahn ja Blakely 2002).

## 6.1 Alkoholi- ja huumausaineriippuvuus

Dopaminergisen järjestelmän keskeinen rooli alkoholin ja muiden huumaavien aineiden käytössä ja riippuvuuden kehittymisessä on tunnettu jo pitkään (Camí ja Farré 2003). Huumaavien aineiden käytön aiheuttama voimakas dopamiinipitoisuuden nousu johtaa hermosolujen jatkuvaan stimulaatioon ja mielihyvän tunteen syntymiseen.

Ainakin osasyyn taipumukselle alkoholismiin, tupakoimiseen ja huumeriippuvuuteen uskotaan lisäksi liittyvän DAT:n epänormaaliin toimintaan ja polymorfioihin (Gelernter ym. 1994; Robbins ja Everitt 1999; Köhnke ym. 2005). DAT ei kuitenkaan ole yksin vastuussa stimulanttien välittämästä mielihyvän määrästä ja käytön palkitsevuudesta, sillä myös DAT:n suhteen poistogeeniset hiiret itseannostelevat kokaiinia ja antavat sille positiivisen tuloksen ehdollistetussa paikkahakuksessa (Rocha ym. 1998). Polymorfiat myös muissa transporttereissa saattavat siis olla osallisena addiktiossa.

40 emäsparin toistoista 9 toistojakson toistuma on yhdistetty tutkimuksissa vähentyneeseen DAT:n määrään ja vähentyneeseen dopamiinin takaisinottoon (Fuke ym. 2001). 7 toistojakson määrä taas oli selvästi yleisempi alkoholisteilla, joilla oli pistemutaatio aldehydidehydrogenaasi-2-geenissä, kuin normaalilla väestöllä japanissa tehdyssä tutkimuksessa (Muramatsu ja Higuchi 1995). Lisäksi ainakin muutamat yhden nukleotidin polymorfiat lisäävät taipumusta riippuvuuden kehittymiseen ihmisillä (Ueno

ym. 1999). Tutkimukset aiheesta ovat kuitenkin usein olleet keskenään hyvin ristiriitaisia.

Aivokuvantamistutkimusten perusteella runsas alkoholin käyttö saattaa vaikuttaa DAT-geenin ilmentymiseen keskushermostossa (Xu ja Lin 2011). Alkoholiiriippuvaisilla ihmisillä DAT:n määrä oli vähentynyt striatumissa terveisiin kontroleihin verrattuna (Laine ym. 1999a). DAT-tasot palasivat kuitenkin takaisin normaalille tasolle neljän viikon kuluttua käytön lopettamisesta. Tulosten perusteella runsaan alkoholin käytön aiheuttamat vaihtelut DAT:n määrässä häiritsevät dopamiinin normaalia kuljetusta synapsissa. Tämä saattaa altistaa uudelle retkahdukselle alkoholin käytön lopettamisen jälkeen.

Intialaisella väestöllä tehdyssä tutkimuksessa havaittiin DAT-geenin A9 alleelin olevan yhteydessä alttiudelle alkoholismiin (Bhaskar ym. 2012). Länsieurooppalaisilla sama alleeli on puolestaan yhdistetty alkoholismiin, mutta ei vieroitusoireisiin tai päivittäiseen alkoholin kulutukseen (Köhnke ym. 2005). Tulokset ovat kuitenkin väestöstä riippuvaisia, sillä on myös useita tutkimuksia, joissa yhteyttä ei löydetty. 13 eri väestöön perustuvaa geneettistä tutkimusta kattaneessa vertailevassa tutkimuksessa tultiinkin siihen tulokseen, ettei ainakaan 40 emäsparin toistojen määrällä ollut tilastollista merkitsevyyttä alkoholiriippuvuudessa (Xu ja Lin 2011). Yhteyttä polymorfiaan ei havaittu olevan myöskään maantieteellisellä alueella, etnisyydellä tai sukupuolella.

DAT-genotyypin ja huumeriippuvuuden yhteydestä on myös saatu viitteitä (Gelernter ym. 1994; Lott ym. 2005). Kliinisessä tutkimuksessa, jossa vertailtiin amfetamiinin aiheuttamaa vastetta, havaittiin että alleelin 10 suhteen homotsygoottisissa (10/10) ja heterotsygoottisissa (9/10) henkilöissä vaste amfetamiinille oli odotetunlainen, sillä se aiheutti euforiaa ja levottomuutta (Lott ym. 2005). 9/9-genotyypissä amfetamiinin vaikutus ei sen sijaan eronnut plasebosta, minkä perusteella tämän genotyypin voisi olettaa suojaavan riippuvuudelta. Kokaiinilla tehdyssä tutkimuksessa DAT-genotyyppi on puolestaan yhdistetty kokaiinin aiheuttaman vainoharhaisuuden lisääntymiseen (Gelernter ym. 1994).

## 6.2 ADHD

Dopaminergisen järjestelmän alitoiminta sekä poikkeavuudet striatumin dopamiinitransportterin määrässä ja toiminnassa uskotaan olevan ainakin osasyynä ADHD:n patogeneesissä (Fusar-Poli ym. 2012). Oletusta tukee se, että tehokkaimpia lääkkeitä ADHD:n hoidossa ovat metyyllifenidaatin ja amfetamiinin kaltaiset DAT:n kautta vaikuttavat psykostimulantit (Seeman ja Madras 1998). SPECT- tai PET-kuvantamisen avulla tehdyissä tutkimuksissa on kuitenkin saatu viitteitä niin vähentyneestä kuin lisääntyneestäkin transportterin määrästä (Madras ym. 2002; Volkow 2009). Yhdeksän tutkimusta käsittäneessä meta-analyysissä todettiin striatumin DAT-tiheyden olevan keskimäärin 14 % korkeampi ADHD:ä sairastavilla terveisiin kontroleihin verrattuna (Fusar-Poli ym. 2012). Tiheys kuitenkin vaihteli sen mukaan oliko henkilöllä aikaisemmin ollut käytössä psykostimulanttilääkitys: Aikaisempaa lääkitystä saaneilla transportterin tiheys oli korkeampi kuin lääkkeen suhteen naiiveilla.

Useissa tutkimuksissa on lisäksi todettu yhteys DAT-geenin polymorfoiden ja ADHD:n välillä, vaikka myös eriäviä tuloksia on saatu (Todd ym. 2005; Cheuk ym. 2006). Poikkeavat DAT-pitoisuudet ADHD:ä sairastavilla viittaavat kuitenkin tähän mahdollisuuteen (Fusar-Poli ym. 2012). On myös mahdollista, että muutokset DAT:n määrässä liittyvät ainoastaan tiettyyn ADHD:n alatyyppiin, mikä selittäisi myös ristiriitaisia tuloksia, ja sitä miksi lääkitys tehoaa vai osalla potilaista.

## 6.3 Masennus

Monoamiinihypoteesin mukaan masennuksen taustalla on häiriö aivojen serotoniini-, eli 5-hydroksitryptamiini-järjestelmässä (Duman 1997). Mesolimbisella dopamiiniradastolla ja dopamiinireseptoreilla saattaa kuitenkin olla myös tärkeä rooli sen synnyssä (Dunlop ja Nemeroff 2007). Tämän teorian mukaan vaikeassa masennuksessa dopamiinin vapautuminen on vähentynyt, mikä johtaa kompensatorisiin mekanismeihin, kuten postsynaptisten dopamiinireseptorien määrän lisääntymiseen ja

vastaavasti DAT-tiheyden vähenemiseen. DAT-tiheyden väheneminen on pystytty todentamaan myös kuvaamalla masennusta sairastaneiden itsemurhan tehneiden henkilöiden aivoja autoradiografisesti (Klimek ym. 2002). DAT:n sekä muiden monoamiinitransporttereiden merkitys masennuksessa on kuitenkin edelleen epävarma (Laasonen-Balk ym. 1999).

Eriäviä tuloksia on saatu tutkimuksessa, jossa dopamiinitransportterin pitoisuuden havaittiin olevan selvästi kohonnut masennusta sairastavilla ihmisillä terveisiin verrokkeihin verrattuna (Laasonen-Balk ym. 1999). Tutkijat selittivät tulosta sillä, että kohonnut DAT-pitoisuus olisi ensisijainen muutos joka edelleen johtaisi alentuneeseen dopamiinipitoisuuteen, joka taas aiheuttaa masennukselle tyypilliset oireet kuten väsymyksen ja keskittymisvaikeudet.

Laine ym. (1999) sen sijaan tutki dopamiinitransportterin määrän yhteyttä alkoholivieroituksen aikana ilmaantuviin masennusoireisiin SPECT-kuvantamisen avulla (Laine ym. 1999b). Tilastollisesti merkitsevät korrelaatiot saatiin DAT-varianssien ja masennusoireiden ilmenemisen kanssa sekä vieroituksen aikana että sen jälkeen.

#### 6.4 Parkinsonin tauti

Parkinsonin taudille tyypilliset motoriset oireet johtuvat dopamiinihermosolujen selektiivisestä tuhoutumisesta SNpc:n alueella (Tian ym. 2012). Hermosolutuho johtaa myös presynaptisten DAT:n, VMAT2:n ja TH:n vähentymiseen. SPECT-kuvantamisella on selvinnyt, että DAT-pitoisuus on vähentynyt striatumissa erityisesti putamenin alueella jo ennen oireiden alkamista (Haapaniemi ym. 2001; Cilia ym. 2010). Tämän takia kuvantamista käytetäänkin hyväksi Parkinsonin taudin diagnostiikassa (Käypä hoito 2010: Parkinsonin tauti)

DAT:n polymorfoiden osallisuutta taudissa on myös epäilty. Aiheesta tehdyt *in vivo* ja *in vitro* -tutkimukset ovat kuitenkin antaneen ristiriitaisia tuloksia. Le Couteurin ym. (1997) tutkimuksessa havaittiin, että DAT:n 40 emäsparin toistoista yhdeksän ja kymmenen kopioiden toistumat olivat yleisimpiä niin terveillä kuin Parkinsonin tautia

sairastavillakin, mikä oli samassa linjassa aikaisempien tutkimuksien kanssa (Gelernter ym. 1994). 11 kopion toistumaa esiintyi kuitenkin selvästi terveitä kontrolleja enemmän Parkinson-potilailla kasvattaen sairastumisriskin 10-kertaiseksi (Le Couteur ym. 1997). Tutkijat epäilivät syyksi toistojen suuremman määrän yhteyttä MPTP:n kaltaisten toksiinien vaikutuksiin. Suuret toistomäärät saattava heidän mukaansa lisätä DAT:n ilmentymistä, ja helpottaa tätä kautta toksiinien pääsyä soluihin. Toisaalta mikäli polymorfia heikentää DAT:n vaikutusta, lisääntyy solunulkoisen dopamiinin määrä, mikä voi johtaa oksidatiiviseen stressiin.

DAT:n määrä on vähentynyt myös Parkinson-potilaiden veren lymfosyyteissä iästä riippumatta (Caronti ym. 2001; Pellicano ym. 2007). Tarkkaa syytä ilmiölle ei tiedetä, mutta koska vähentyminen on havaittavissa jo taudin kehittymisen varhaisessa vaiheessa, on sitä mahdollista käyttää apuna taudin tunnistamisessa. Ensin tulisi kuitenkin selvittää onko väheneminen spesifistä vain Parkinsonille, vai esiintyykö sitä myös muissa neurodegeneratiivisissa sairauksissa sekä korreloiko puutoksen määrä taudin vakavuusasteen kanssa. Essentiaalisessa vapinassa lymfosyyttien DAT:n määrän ei ole kuitenkaan todettu vähentyneen, mitä voidaanakin käyttää apuna sen ja Parkinsonin taudin erotusdiagnostiikassa (Pellicano ym 2007)

## 7 DAT-ELÄINMALLIT

Dopamiinitransportterin toiminnan ja merkityksen tutkimisen avuksi on kehitetty useita muuntogeenisiä eläinmalleja, jotka joko yli- tai ali-ilmentävät transportteria (Zhuang ym. 2001; Salahpour ym. 2008). Myös DAT:n suhteen kokonaan poistogeeninen hiirikanta on olemassa (Giros ym. 1996). Mallit tarjoavat hyvän mahdollisuuden tutkimukseen. Ongelma eläinmallien kanssa on kuitenkin geenin poiston aiheuttamat kompensatorisen muutokset täysikasvuissa hiirissä. Toinen samankaltainen proteiini voi esimerkiksi korvata poistetun proteiinin toimintaa, vähentäen näin eläinmallilla saatujen tulosten hyödyntämistä tutkimuksessa.



## 7.1 DAT knock out -hiiret

Poistogeenisiltä DAT knock out -hiiriltä (DAT-KO) puuttuu elimistöstä kokonaan DAT-transportteri (Giros ym. 1996). Homotsygooteilla DAT-poistogeenisillä hiirillä dopamiini säilyy solunulkoisessa tilassa 100–300 kertaa pidempään villityypin hiiriin verrattuna, mikä viittaa siihen, että diffuusio pois synapsiraosta on ainoa mekanismi vapautuneen dopamiinin vaikutuksen päättämiseksi näillä hiirillä. *In vivo* -mikrodialyysissä määritetyt dopamiinipitoisuudet striatumissa ja akkumbens-tumakkeessa olivat myös moninkertaiset villityyppiin verrattuna. *In vivo* -voltageometriassa puolestaan dopamiinin vapautuminen oli vähäisempää ja puoliintumisaika pidentynyt yli 300-kertaiseksi.

Poistogeenisten hiirten käytöksessä ilmenee luonnostaan useita amfetamiinin ja kokaiinin käytölle tyypillisiä oireita kuten voimakasta hyperaktiivisuutta, jollaista esiintyy villityypin hiirillä vasta maksimaalisen psykostimulantin annostelun jälkeen (Giros ym. 1996; Rocha ym. 1998). Hiiret eivät myöskään totu uuteen ympäristöön helposti, ja niiden aktiivisuus open field -kokeessa oli 12-kertainen kontrolleihin verrattuna (Gainetdinov ym. 1999). Amfetamiinin, kokaiinin tai metyyliifenidaatin annostelu ei kuitenkaan aiheuttanut enää lisää muutoksia poistogeenisten hiirten aktiivisuudessa tai dopamiinin vapautumisessa toisin kuin normaaleilla hiirillä (Giros ym. 1996; Gainetdinov ym. 1999). Päinvastoin näillä aineilla oli jopa rauhoittava vaikutus hiiriin (Gainetdinov ym. 1999). Lisätutkimukset osoittivat tämän välittyvän todennäköisesti serotonergisen järjestelmän kautta, jonka inhibitorisen vaikutuksen teho riippuu villityypin ja KO-hiirten vallitsevasta dopaminergisestä tonuksesta.

Ehdollistetussa paikkahakuisuus- ja itseannostelukokeissa kokaiinilla saatiin sen sijaan yllättäen positiivinen tulos, vaikka itseannostelun kriteerien täyttyminen vaatiikin useamman annostelukerran (Sora ym. 1998). Syynä tähän on todennäköisesti NET ja SERT, jotka DAT:n puuttuessa pystyvät korvaamaan sen välittämät palkitsevat vaikutukset, vaikka niiden on tavallisesti uskottu välittävät pääasiallisesti DAT:n välityksellä (Sora ym. 1998; Sora ym. 2001). DAT/SERT-poistogeenisiltä hiiriltä, joilta on poistettu DAT:n lisäksi myös SERT, ei vastetta kokaiinilla samassa koejärjestelyssä enää saatu (Sora ym. 2001). Poistogeenisille hiirille on myös todennäköisesti kehittynyt

DAT:n puutetta kompensoivia muutoksia, mikä vaikeuttaa tulosten tulkintaa (Tilley ym. 2007).

DAT-poistogeenisiltä hiiriltä on löydetty myös muita poikkeavuuksia sekä käyttäytymisessä että keskushermoston rakenteessa (Bossé ym. 1997). Monet muutoksista ovat kompensatorisia vähentyneelle dopamiinin takaisinotolle. DAT-KO-hiirten sekä pre- että postsynaptisten D1- ja D2-reseptorien proteiini- ja mRNA-tasot ovat pienentyneet, ja reseptorien ilmentyminen oli vain 50 % normaalista (Giros ym. 1996). Niiden kuolleisuus on suuri ja niillä ilmenee aivolisäkkeen etulohkon vajaakehitystä, kääpiökasvuisuutta sekä ongelmia maidon tuotannossa (Bossé ym. 1997).

## 7.2 DAT knock down -hiiret

Kaksi eri kantaa ilmentää DAT:n heikentynyttä vaikutusta (Zhuang ym. 2001; Salahpour ym. 2007). DAT knock down (DAT-KD) -hiirillä DAT:n toiminta on heikentynyt kaikkialla elimistössä. Paikallisesti DAT-KD-hiiriltä on sen sijaan pienen häiritsevän RNA:n (siRNA) injektion avulla hiljennetty DAT-geenin toiminta ainoastaan substantia nigraa ja VTA:ssa (Salahpour ym. 2007).

DAT-KD-hiirillä DAT:n määrä keskushermostossa on ainoastaan 10 % normaalista, mikä johtaa 70 % korkeampiin solunulkoisiin dopamiinipitoisuuksiin, sillä dopamiinin takaisinotto on hidastunut (Zhuang ym. 2001). Hiirten kasvu on normaalia, mutta niiden käytöksessä ilmenee poikkeavuuksia kuten ylivilkkautta, ja ne myös tottuvat uuteen ympäristöön hitaammin. Poikkeavuudet ovat kuitenkin lievempiä kuin kokonaan poistogeenisellä kannalla.

Vähentyneestä DAT:n määrästä ja selvästi koholla olevasta basaalisesta dopamiinipitoisuudesta huolimatta hiirten reagointi kokaiinille oli kuitenkin normaalia (Tilley ym. 2007). Kokaiini lisäsi samalla tavalla sekä villityypin että KD-hiirten liikeaktiivisuutta, eikä genotyyppien välillä ollut suurta eroa myöskään ehdollistetussa paikkahakuisuus -kokeessa. Tutkimus vahvistaakin oletusta siitä, että kokaiinin

palkitsevat vaikutukset ja liikeaktiivisuuden lisäys ovat riippuvaisia DAT:n toiminnasta, sillä knock down -hiirillä tehdyt kokeet antavat todennäköisesti luotettavamman tuloksen kuin kokonaan poistogeenisillä tehdyt.

Paikallisesti DAT-KD-hiirillä DAT:n määrä striatumissa on vähentynyt 35 % ja TH:n 40 % normaaliin verrattuna (Salahpour ym. 2007). Amfetamiini lisäsi niillä vähemmän liikeaktiivisuutta DAT-poistogeenisiin hiiriin verrattuna, ja hiirten käyttäytyminen kokeissa oli verrattavissa DAT-HET-hiiriin, joiden DAT-proteiinitaso on 50 % normaalista.

DAT-KD-hiiret tarjoavat hyvän mallin psykostimulanttien tutkimukselle. Niitä voidaan hyödyntää erityisesti selvittäessä näiden lääkeaineiden rauhoittavaa vaikutusta erilaisissa neurologisissa sairauksissa (Zhuang ym. 2001). Paikallisten knock down -hiirten etuna on lisäksi geenin hiljentäminen vasta täysikasvuisilla hiirillä, mikä vähentää kompensatorisia muutoksia, joita vähentynyt DAT-proteiinin määrä saattaa aiheuttaa (Salahpour ym. 2007). Lisäksi niiden tuottaminen on yksinkertaisempaa tavallisiin muuntogeenisiin hiiriin verrattuna.

### 7.3 DAT knock in -hiiret

DAT knock in -hiirikanta yli-ilmentää dopamiinitransportteria (Salahpour ym. 2008). Hiirten striatumleikkeitä tutkimalla määritetty DAT-pitoisuus on kolminkertainen villityyppiin verrattuna, mutta synaptisella solukalvolla proteiinin määrä on sen sijaan vain 30 % normaalia korkeampi. Tämän seurauksena myös dopamiinin takaisinotto on tehostunut 50 %, mikä johtaa solunulkoisen dopamiinipitoisuuden laskuun lähes puoleen normaalista.

Villityyppiin verrattuna knock in -hiirten liikeaktiivisuus sekä vaste ehdollistetussa paikkahakuisuuskokeessa olivat selvästi kohonneet amfetamiinin annostelun jälkeen (Salahpour ym. 2008). Amfetamiinin aiheuttama vaste ehdollistetussa paikkahakuisuuskokeessa saatiin myös huomattavasti matalammalla annoksella (0,2

mg/kg ja 0,5 mg/kg vs 2 mg/kg) kuin villityypin hiirillä. Dopamiinivaste oli myös kolminkertainen, mikä korreloi DAT:n lisääntyneen ilmentymisen kanssa.

## 8 YHTEENVETO

Keskushermoston dopaminerginen järjestelmä on useiden neurologisten sairauksien kuten Parkinsonin taudin, ADHD:n, skitsofrenian ja huumeaddiktion taustalla, minkä takia tarve siihen vaikuttaviin lääkeaineisiin on suuri. Dopamiinitransportteri on keskeisessä roolissa tämän järjestelmän ylläpidossa ja säätelyssä, minkä takia sen ominaisuuksien tunteminen ja toiminnan säätelyn tarkka ymmärtäminen on erittäin tärkeää.

Tutkimukset ovat paljastaneet DAT:n säätelyn tapahtuvan usealla eri tasolla, ja se on mahdollista niin pitkäkestoisesti kuin nopeastikin useiden eri mekanismien kuten proteiinikinaasien, fosfataasien, reseptorien sekä monien muiden yhdisteiden toimesta. Uusien DAT:n toimintaa muokkaavien signaalireittien ja proteiinien löytäminen on helpottanut sen toiminnan ymmärtämistä. Lukuisat eläinmallit ovat myös olleet apuna, ja niitä on käytetty laajasti myös huumaavien aineiden kuten amfetamiinin ja kokaiinin vaikutusten parempaan kartoittamiseen.

Laajasta tutkimustyöstä huolimatta DAT:n täydellinen toimintamekanismi sekä merkitys neurologisissa sairauksissa ovat edelleen osin tuntemattomia, vaikka häiriöt transportterin toiminnassa sekä monet sen polymorfiset muodot ovatkin jo tiedossa. Tämän takia lisää DAT:n toimintamekanismia selvittäviä tutkimuksia olisikin hyvä tehdä.

Mikäli DAT:n toiminta opitaan tuntemaan paremmin, ja uusia, siihen spesifisesti vaikuttavia yhdisteitä löydetään, tarjoaa se mielenkiintoisen vaikutuskohteen useiden neurologisten sairauksien hoitoa ajatellen. Erityisesti DAT:n toimintaa lisäävien DAT-agonistien löytyminen voisi tuoda uusia mahdollisuuksia DAT:n toimintahäiriöiden parempaan hallintaan. Lisäksi DAT:n merkityksen ymmärtäminen myös

keskushermoston ulkopuolella, kuten lymfosyyteissä, voi tuoda lisää keinoja muidenkin kuin neurologisten sairauksien hoitoon.

## II Kokeellinen osa

GDNF:n merkitys addiktiossa: Amfetamiinin vaikutus  
striatumin dopamiinipitoisuuteen MEN2B- ja  
GDNF-cKO-hiirikannoilla

## II KOKEELLINEN OSA

### 1 JOHDANTO

Erikoistyöni oli osa tutkimusta, jonka tarkoituksena on tutkia endogeenisen gliasolulinjaperäisen hermokasvutekijän (GDNF) roolia ja toimintamekanismia huumeriippuvuuden kehittämisessä ja ylläpidossa.

Huumeriippuvuus on merkittävä kansainvälinen ongelma, jonka hoitomahdollisuudet ovat huonot, sillä siihen kunnolla tehoavia lääkkeitä ei ole saatavilla. Yksin Suomessa oli Terveiden ja hyvinvoinnin laitoksen vuoden 2005 tilaston mukaan 14500–19100 huumeiden ongelmakäyttäjää, eli 0,6–0,7 % koko maan 15–55-vuotiaasta väestöstä (Hakkarainen ym. 2011). Suurin osa ongelmakäytöstä liittyi amfetamiiniin.

Huumaavat aineet kuten amfetamiini, morfiini ja kokaiini nostavat solunulkoisen dopamiinin määrää dorsaalisen striatumin ja akkumbens-tumakkeen alueella sekä jyrksijöillä että ihmisillä aktivoitua voimakkaasti keskushermostoa (Ghitza ym. 2010). Nykyisen käsityksen mukaan toistuva huumaavien aineiden käyttö aiheuttaa pitkäkestoisia plastisia muutoksia aivoissa erityisesti mesokortikolimbisessä dopamiiniradastossa ja glutamatergisessä kortikolimbisessä järjestelmässä. Tämän uskotaan aiheuttavan huumeiden käytön pakonomaisen tarpeen sekä altistavan retkahtamiselle vielä pitkänkin ajan kuluttua käytön lopettamisesta.

Tutkimuksen kohteena ollut GDNF on gdnf-geenin koodaama proteiini, joka on keskeisessä roolissa dopamiinihermosolujen kasvussa, selviytymisessä ja erilaistumisessa, ja se osallistuu myös oppimisen ja muistin säätelyyn (Airaksinen ja Saarma 2002). Se kuuluu transformoivan kasvutekijä beetan suurperheeseen yhdessä neurturiinin (NRTN), artemiinin (ARTN) ja persefiinin (PSPN) kanssa, ja sitä ilmentetään kaikkialla keskushermostossa alkiokehityksen aikana (Airaksinen ja Saarma 2002; Sariola ja Saarma 2003). Aikuisilla GDNF:ä esiintyy kuitenkin lähinnä vain striatumin, aivokuoren, hippokampuksen ja talamuksen alueella.

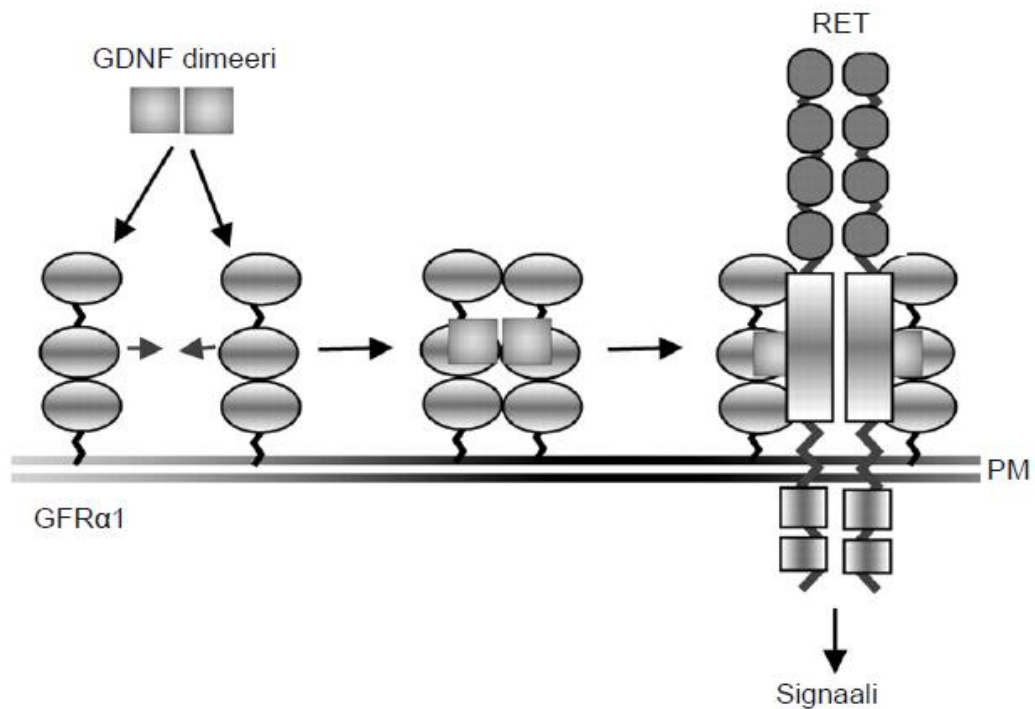
Eksogeenisen GDNF:n on osoitettu suojelevan keskiaivojen dopaminergisia hermosoluja ja palauttavan niiden toimintaa Parkinsonin taudin eläinmalleissa (Gash ym. 1996; Åkerud ym. 2001). Suoraan keskushermostoon annosteltu GDNF on myös useassa faasin 1 kliinisessä tutkimuksessa vähentänyt Parkinson-potilaiden motorisia oireita ja parantanut elämänlaatua (Gill ym. 2003; Slevin ym. 2006). Kliinisiä kokeita Parkinson-potilailla on myös edelleen käynnissä. Parkinsonin taudin ohella dopaminergisen järjestelmän keskeinen rooli addiktiossa on myös johtanut siihen, että GDNF:ä kohtaan on herännyt suuri kiinnostus myös huumeriippuvuustutkimuksessa (Carnicella ja Ron 2009; Ghitza ym. 2010).

Huumeiden käytön yhteydessä GDNF näyttäisi estävän addiktion kehittymistä, sillä suoraan keskushermostoon annosteltuna rekombinantti eksogeeninen GDNF:n on useissa tutkimuksissa vähentänyt huumeiden aiheuttamia muutoksia käyttäytymisessä ja aivojen biokemiassa (Ghitza ym. 2010). Päinvastaisia tuloksiakin on toisaalta saatu, ja vaikutukset vaihtelevat tutkittavasta aivoalueesta ja lääkeaineesta riippuen (Lu ym. 2009; Airavaara ym. 2011). Ongelmana kuitenkin on, että eksogeeninen GDNF ei välttämättä vaikuta samalla tavalla kuin elimistön normaali endogeeninen muoto, eli tuloksista ei voida suoraan vetää johtopäätöksiä endogeenisen GDNF:n roolista. Endogeenisen GDNF:n tutkiminen on myös ollut haastavaa, sillä GDNF:n suhteen homotsygoottiset poistogeeniset (GDNF<sup>-/-</sup>) hiiret eivät ole elinkykyisiä, vaan kuolevat heti syntymänsä jälkeen, sillä niiltä puuttuu kokonaan enteerinen hermosto ja niillä on kehityshäiriöitä virtsanjohtimissa ja munuaisissa (Moore ym. 1996; Pichel ym. 1996). Äskettäin on kuitenkin kehitetty GDNF:n suhteen konditionaalinen poistogeeninen hiirikanta (GDNF-cKO), jolta GDNF voidaan poistaa ainoastaan keskushermostosta mahdollistaen niiden käytön tutkimuksessa.

GDNF:n toimintamekanismiakaan ei ole kuitenkaan vielä täysin pystytty selvittämään, sillä sen signalointimekanismi on hyvin monimutkainen (Sariola ja Saarma 2003). Sen havaittiin signaloivan pääasiassa tyrosiinikinaasireseptorin (Ret) kautta sitoutumalla ensin spesifiseen solukalvon pinnalla kiinni olevaan apureseptoriinsa (GFR $\alpha$ 1) (Kuva 5). Dimerisoituneen GDNF:n sitoutuminen kahteen GFR $\alpha$ 1:en aiheuttaa kahden Ret-molekyylin dimerisaatioon, jolloin niiden tyrosiinikinaasialueet transfosforyloituvat. Tämä johtaa signaalin välittyminen solun sisälle, ja edelleen useiden kinaasien



aktivaatioon. Ret:n lisäksi GDNF:lle on kuitenkin myöhemmin löydetty myös muita vaihtoehtoisia signaalinvälitysreittejä (Cao ym. 2008; Besspalov ym. 2011).



Kuva 5: Ret-tyrosiinikinaasin toiminta. Dimerisoitunut GDNF yhdistää kaksi GFRα1-apureseptoria. Tämä johtaa kahden Ret:n dimerisaatioon ja niiden tyrosiinikinaasialueiden transfosforylaatioon, jonka seurauksena Ret:n tyrosiinikinaasialueet transfosforyloituvat ja se välittää signaalin solun sisälle (Sariola ja Saarma 2003).

GDNF:n lisäksi Ret on myös muiden GDNF-perheeseen kuuluvien ligandien yleinen signalointireseptori (Airaksinen ja Saarma 2002). Se ilmentyy keskushermostossa laajalla alueella niin luustolihaksia hermottavissa aivorungon ja selkäytimen motorisissa hermosoluissa kuin dopaminergisissä ja noradenergisissä sekä perifeerisissä enterisissä, sympaattisissa, parasympaattisissa ja sensorisissa hermosoluissakin (Nosrat ym. 1997; Glazner ym. 1998; Golden ym. 1999). Keskushermoston ulkopuolella Ret:ä esiintyy ainakin munuaisissa, ruoansulatuskanavassa, lisämunuaisissa ja kilpirauhasessa (Nosrat ym. 1997; Golden ym. 1999).

Tässä erikoistyöhöni kuuluvassa tutkimuksessa tutkittiin kahden eritavalla GDNF:n suhteen muuntogeenisen hiirikannan, MEN2B- ja GDNF-cKO-hiirten, herkkyyttä amfetamiinille määrittämällä amfetamiinin aiheuttamat muutokset striatumin dopamiinipitoisuuksissa akuutin ja toistetun annostelun seurauksena. Tutkimusmenetelmänä käytettiin *in vivo* -mikrodialyysiä, sillä se mahdollistaa keskushermoston välittäjäaineiden solun ulkoisten pitoisuuksien seuraamisen ajan funktiona. Koe voidaan myös toistaa samoja hiiriä käyttäen, jolloin mahdollinen amfetamiinille kehittynyt herkistyminen tai toleranssi voidaan havaita.

MEN2B-hiiret soveltuvat hermokasvutekijöiden tutkimukseen erinomaisesti, sillä niiden Ret-signaali on jatkuvasti aktiivinen Met918Thr-mutaatiosta johtuen (Smith-Hicks ym. 2000). Konditionaaliset poistogeeniset GDNF-hiiret tarjoavat sen sijaan päinvastaisen mahdollisuuden tutkia GDNF:n merkitystä, sillä niiden avulla on mahdollista selvittää GDNF:n puutteen vaikutus addiktion kehittymiseen. Näiden keskenään erilaisten hiirikantojen avulla olikin nyt tarkoitus selvittää, mikä rooli GDNF:llä on striatumiin synapsoivien dopamiinineuronien toiminnassa ja plastisuudessa.

## 2 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

### 2.1 Koe-eläimet

Koe-eläiminä käytettiin Helsingin yliopiston koe-eläinkeskuksessa kasvatettuja muuntogeenisiä MEN2B-uroshiiriä sekä Helsingin yliopiston biotekniikan instituutissa kehitettyjä GDNF:n suhteen konditionaalisia poistogeenisiä uros- ja naarashiiriä. Molemmat hiirikannat jaettiin genotyyppin mukaan kolmeen ryhmään: MEN2B-hiiret homotsygootteihin (Homo), heterotsygootteihin (Het) ja villin tyypin hiiriin (Wt), ja GDNF-cKO-hiiret villin tyypin hiiriin (Wt), heterotsygoottisiin (Het) sekä homotsygoottisiin poistogeenisiin knock out -hiiriin (cKO).

Hiiret olivat kokeiden aikana 8–16 viikon ikäisiä ja painoivat keskimäärin 20–45 g. Ne säilytettiin 2–7 hiiren ryhmissä Makrolon-laatikoissa, ja ruokaa (Harlan Teklad, Alankomaat) ja vesijohtovettä oli tarjolla *ad libitum*. Koe- ja asuintilojen valopimeäsykli oli 12 h valoisan ajan ollessa kello 6–18. Kokeet suoritettiin päiväsaikaan. Ympäristön lämpötila oli 20–22 °C ja suhteellinen ilmankosteus 50–60 %. Kaikilta hiiriltä varmistettiin genotyyppi korvasta otetusta näytepalasta ennen kokeiden aloittamista. Kokeet olivat Etelä-Suomen lääninhallituksen ja Helsingin yliopiston koe-eläintoimikunnan hyväksymiä.

MEN2B-hiirten taustakanta oli C57/Bl6:ICR:129/SV. Kanta on kehitetty siirtämällä ihmisen Met918Thr:ä vastaava pistemutaatio Met919Thr hiiren endogeeniseen Retgeeniin, mikä johtaa reseptorin jatkuvaan aktivaatioon (Smith-Hicks ym. 2000; Mijatovic ym. 2007). Ihmisillä ituradan Met918Thr-mutaatio johtaa harvinaiseen tyyppi 2 multippeliin endokriiniseen neoplasiaan (MEN2B), eli autosomaalisesti dominantisti periytyvään syöpäoireyhtymään. Mutaation seurauksena MEN2B-hiirten dopamiinin ja sen metaboliittien pitoisuudet ovat koholla striatumissa, aivokuorella ja hypotalamuksessa (Mijatovic ym. 2007). Striatumin dopamiinipitoisuus on eniten kohonnut, sillä se on kaksinkertainen normaaliin verrattuna. Serotoniinipitoisuudet ovat sen sijaan normaalit ja noradrenaliinin pitoisuus on vain hieman koholla aivorungon alaosissa. TH-proteiinin pitoisuus on kohonnut striatumissa ja substantia nigra/ventraalisessa tegmentumissa (SN/VTA).

Sekä heterotsygootit MEN2B-/+ että homotsygootit MEN2B/MEN2B-hiiret ilmentävät useita samoja oireita kuin samaa geenimutaatiota kantavat ihmisetkin, joilla oireyhtymä aiheuttaa kasvaimia kilpirauhasen, lisäkilpirauhasen ja munuaisten alueella. Homotsygooteilla oireet ilmenevät kuitenkin aikaisemmin ja pahempina (Mijatovic ym. 2007). Syöpäoireyhtymä kehittyy hiirille silti vasta 3–4 kuukauden iässä, mikä mahdollistaa niiden käytön aivotutkimuksessa.

Konditionaalisilta GDNF-poistogeenisiltä hiiriltä puuttuu GDNF kokonaan vain keskushermostosta, mutta muualla elimistössä se ilmentyy normaalisti. GDNF:n poisto vain tietystä osasta elimistöä on mahdollista Cre/loxP-tekniikkaa käyttäen (Sauer 1998). Siinä on risteytetty keskenään kaksi muuntogeenistä hiirikantaa: Cre-rekombinaasia kantava hiirikanta, jossa Cre ilmennettiin keskushermostolle spesifisen nestinin

promoottorin alaisuudessa ja vastaanottava loxP-kanta, jossa haluttu kohdegeeni (GDNF:n eksoni 3) on ympäröity loxP-alueilla. Risteyksen tuloksena F1-sukupolveen syntyy 50 % loxP-alleelin ja Cre:n suhteen heterotsygoottisia hiiriä. Risteyttämällä tämän jälkeen keskenään Wt/cKO+Cre- ja Wt/cKO-hiiret, saadaan F2-polveen haluttuja genotyypiltään homotsygoottisia cKO/(c)KO+Cre-hiiriä noin 1/8. GDNF:n puuttumisesta huolimatta GDNF-cKO-hiirten stritaumin dopamiinipitoisuus ei eroa villityypin hiiristä (Andressoo ym. julkaisematon tulos 2012).

## 2.2 Tutkittavat lääkeaineet

Kokeissa käytetty amfetamiinisulfaatti oli syntetisoitu Helsingin yliopiston Farmasian tiedekunnan farmaseuttisen kemian osastolla. Mikrodialyysin aikana annosteltu amfetamiiniliuos valmistettiin liuottamalla 1,84 mg d-amfetamiinisulfaattia 100 ml:aan Ringer-liuosta. Mikrodialyysipäivien välissä suoraan vatsaonteloon annostelu amfetamiiniliuos valmistettiin liuottamalla d-amfetamiinisulfaattia 0,9 %:een keittosuolaliuokseen (NaCl) vapaana emäksenä laskettuna, niin että annokseksi tuli 1 mg/kg. Injektioilavuutena käytettiin 10 ml/kg.

Lääkeaineiden pitoisuudet valittiin kirjallisuudessa ja aikaisemmissa tutkimuksissa sopivaksi osoittautuneiden perusteella.

Ringer-liuos valmistettiin liuottamalla käytetyt aineet ultrapuhtaaseen UHQ-veteen, niin että pitoisuuksiksi liuoksessa saatiin natriumkloridi 147 mM, kalsiumkloridi 1,2 mM, kaliumkloridi 2,7 mM, magnesiumkloridi 1,0 mM ja askorbiinihappo 0,04 mM.

## 2.3 Stereotaktinen leikkaus

Hiirille asennettiin ohjauskanyyli (MAB 4.1, Agn Tho's AB, Lidingö, Ruotsi) dorsaaliseen striatumiin vasemmalle puolelle stereotaktisella leikkauksella. Hiiret pidettiin leikkauksen aikana inhalaatioanestesiassa isofluraanilla (4,5 % induktio, 1,5-

2,5 % ylläpito, Baxter Oy, Helsinki, Suomi). Hiiret kiinnitettiin molemmista korvakäytävistä stereotaktiseen laitteistoon (Stoelting, Wood Dale, Illinois, USA). Kipulääkityksenä hiirille annettiin leikkauksen aikana buprenorfiiniliuosta (Temgesic 0,3 mg/ml, Schering-Plough Europe, Brysseli, Belgia) 0,05 mg/kg s.c. Paikallispuudutteena käytettiin lidokaiinin ja adrenaliinin seosta (Lidocain c adrenalin 10 mg/ml + 10 µg/ml, Orion Oyj, Suomi), joka pistettiin päänahan alle. Karvat ajeltiin karvaleikkurilla pääläeltä ja nahka avattiin saksilla. Luukalvot raaputettiin kirurgiveitsen avulla pois niin että kallon rakenteet erottuivat selvästi. Ohjauskanyylin koordinaatin määritettiin suhteessa Bregma-pisteeseen. Dorsaalisen striatumin koordinaatit olivat A/P = + 0,6, L/M = +1,8, D/V = -2,2 Franklinin ja Paxinoksen hiiren aivoatlaksen (1997) mukaan. Määritettyyn pisteeseen porattiin reikä, johon kanyyli laskettiin. Kalloon porattiin myös kaksi reikää tukiruuveja varten. Kanyyli kiinnitettiin kallon pintaan ja tukiruuveihin hammassementillä (Aqualox, Voco, Saksa). Leikkauksen jälkeen hiiret sijoitettiin mikrodialyysiä varten toipumaan yksilöhäkkeihin, joissa ne myös olivat kokeen loppuun asti.

## 2.4 Mikrodialyysi

Kanyloiduille hiirille suoritettiin yhteensä kaksi mikrodialyysiä päivinä 1 ja 4 sen jälkeen kun ne olivat saaneet toipua stereotaktisesta leikkauksesta 4-7 päivän ajan. Koepäivän aamuna hiirten kalloon kiinnitettyyn ohjauskanyyliin vaihdettiin mikrodialyysikoetin (MAB 4.9.1.Cu, Agn Tho's AB, Lidingö, Ruotsi, membraanin halkaisija 0,2 mm), jonka avulla näytteet kerättiin hiirten dorsaalisesta striatumista. Koetinta perfusoiitiin aluksi Ringer-liuoksella 2,0 µl/min virtausnopeudella. Hiirten annettiin stabiloitua 120 minuutin ajan, jotta veri-aivoeste ehtisi korjautua. 15 minuuttia ennen stabilointiajan loppumista kerättiin yksi koenäyte, jonka jälkeen varsinaisten näytteiden kerääminen aloitettiin (15 minuutin välein, 30 µl/näyte).

Kahden perustason näytteen keräämisen jälkeen Ringer-liuoksen tilalle vaihdettiin amfetamiinia sisältävä Ringer-liuos, jolla annettiin yhden tunnin mittainen stimulaatio (100 µM). Sisäänmenoletkun pituudesta johtuen kesti noin tunnin, ennen kuin

amfetamiiniliuos saavutti koettimen. Näytteiden keräämistä jatkettiin tämän jälkeen normaalisti, ja amfetamiiniliuos vaihdettiin takaisin tavalliseen Ringer-liuokseen kuudennen näytteen keräämisen jälkeen. 3-4 ensimmäisen näytteen keskiarvon perusteella laskettiin perustaso, johon amfetamiinin aiheuttamia muutoksia välittäjäainepitoisuuksissa verrattiin. Ensimmäisen mikrodialyysin jälkeen mikrodialyysikoetin poistettiin ohjauskanyylista välipäivien ajaksi ja laitettiin takaisin päivänä 4 uutta samanlaista mikrodialyysiä varten.

Dopamiinin ja sen metaboliittien 3,4-dihydroksifenyylietikkahapon (DOPAC) ja homovanilliinihapon (HVA) sekä serotoniinin metaboliitin 5-hydroksi-indolietikkahapon (5-HIAA) pitoisuudet määritettiin korkean erotuskyvyn nestekromatografilla (HPLC) käyttäen elektrokemiallista detektoria (Coulochem II, ESA, Chelmsford, Massachusetts, USA), mikrodialyysikennolla (5014B, ESA, Chelmsford, Massachusetts, USA) ja HPLC-pumpulla (Jasco PU2080, Tokio, Japani). Kolonni (Kinetex 2,6 u, XB-C18, 50 x 4,6 mm, Tanska) pidettiin 40 °C:ssa kolonnin lämmittimellä (Croco-Cil, Saint Foy La Grande, France). Ajoaika näytettä kohden oli 6 minuuttia ja injisointitilavuus 25 µl. Kromatogrammit tulkittiin Azur-integraatio-ohjelmalla (Datalys, Theix, Ranska).

Ensimmäisen ja toisen mikrodialyysin välisinä päivinä hiirille annosteltiin amfetamiiniliuosta suoraan vatsaonteloon 1 mg/kg aina samaan vuorokauden aikaan.

Mikrodialyysikoettimien toimintaa seurattiin tekemällä niille säännöllisin väliajoin probe recovery -testi. Testissä koettimet kytkettiin mikrodialyysilaitteistoon kuten normaalissa mikrodialyysissä, mutta hiiren sijaan koettimet upotettiin suojakoteloidensa sisällä standardiliuokseen, jonka pitoisuus tunnettiin. Koettimien läpi ajettiin Ringer-liuosta ja näytteitä kerättiin 15 minuutin välein neljä kappaletta. Kokeessa oli aina kontrollina mukana kaksi käyttämätöntä koetinta, joihin tuloksia voitiin verrata. Valmistajan lupaama takaisinsaanto koettimille on matala, 5 %. Tämä toteutui suhteellisen hyvin testin tulosten ollessa pääsääntöisesti 5–10 %. Saatujen tulosten perusteella kuluneet ja poikkeavia tuloksia antaneet koettimet poistettiin käytöstä. Keskimäärin yhtä koetinta käytettiin 4–5 mikrodialyysissä.

## 2.5 Aivojen dissekaatio ja aivoleikkeet

Hiiret lopetettiin toisen mikrodialyysin jälkeen dekapitoimalla. Aivot poistettiin nopeasti kallosta, jäädytettiin kuivajäällä ja säilöttiin  $-80^{\circ}\text{C}$ :ssa.

Hiirten aivoista valmistettiin  $90\text{ }\mu\text{m}$  jääleikkeitä kryostaatilla (Leica CM3050 S, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Saksa) mikrodialyysikoettimen oikean paikan varmistamiseksi. Leikkeet kerättiin gelatinoidulle lasille ja dehydratoitiin säilytystä ja myöhempää tarkastelua varten.

Dehydratointi suoritettiin kastamalla leikkeet ensin 70 %:een etanoliin, sitten 96 %:een etanoliin, absoluuttiseen 99 %:een etanoliin ja Histo-Cleariin (National diagnostics, Georgia, USA), jonka jälkeen ne jätettiin kuivumaan yön yli. Liotusaika oli 2,5 minuuttia kussakin liuoksessa.

Valmiiden leikkeiden perusteella koettimen paikka merkittiin valmiille koetinpohjille oikeaan kohtaan (Liitteet 1 ja 2).

## 2.6 Tilastolliset menetelmät

Tilastolliset testit tehtiin SPSS statistics 18.0 -ohjelmalla (SPSS inc., Illinois, USA). Amfetamiinin vaikutus solunulkoiseen dopamiinin ja sen metaboliittien DOPAC:n ja HVA:n sekä 5-HIAA:n pitoisuuksiin laskettiin prosentuaalisena muutoksena perustasosta. Saadut tulokset analysoitiin kaksisuuntaisella toistettujen mittauksien ANOVAlla. Tulokset on esitetty keskiarvoina  $\pm$  SEM. P-arvoa  $<0.05$  pidettiin tilastollisesti merkitseväenä.

### 3 TULOKSET

#### 3.1 Dopamiinivaste MEN2B-hiirillä

Dopamiinivaste saatiin näkyville sekä akuutin että toistetun amfetamiiniannostelun jälkeen MEN2B-hiirillä ja dopamiinin solunulkoinen pitoisuus kohosi selvästi kaikilla hiirillä molemmilla mikrodialyysikerroilla. Tulokset on esitetty kuvissa 8 ja 9. Amfetamiini ei kuitenkaan aiheuttanut tilastollisesti merkitseviä eroja MEN2B-hiirillä eri genotyyppien välillä niin akuutin kuin toistetunkaan annostelun perusteella.

Toisena mikrodialyysipäivänä määritetyt pitoisuudet olivat kuitenkin selvästi alhaisemmat ensimmäisenä päivänä määritettyihin verrattuna (aika 90–155 min;  $F_{1,46}=7,97$ ;  $p=0,007$ ; toistettujen mittauksien ANOVA).

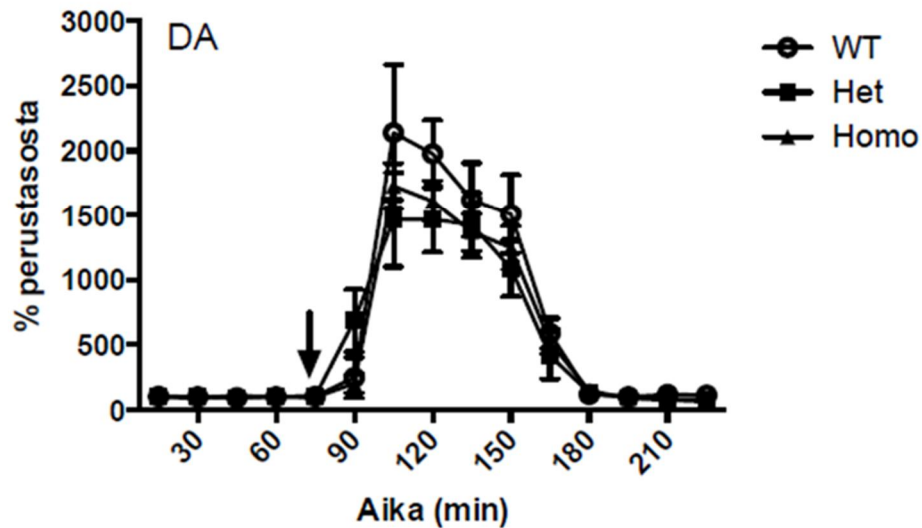
#### 3.2 Dopamiinivaste GDNF-cKO-hiirillä

MEN2B-hiirten tapaan dopamiinivaste saatiin selvästi esille kaikilla genotyypeillä sekä akuutin että toistetun amfetamiiniannostelun seurauksena GDNF-cKO-hiirillä dorsaalisisessä striatumissa. Eri genotyyppien välillä ei kuitenkaan ollut merkitsevää eroa. Tulokset on esitetty kuvissa 10 ja 11.

Ensimmäisen ja toisen mikrodialyysin välillä ero dopamiinivasteessa oli kuitenkin tilastollisesti merkitsevä (aika 90–155 min;  $F_{1,47}=17,2$ ;  $p<0,001$ ; toistettujen mittauksien ANOVA).

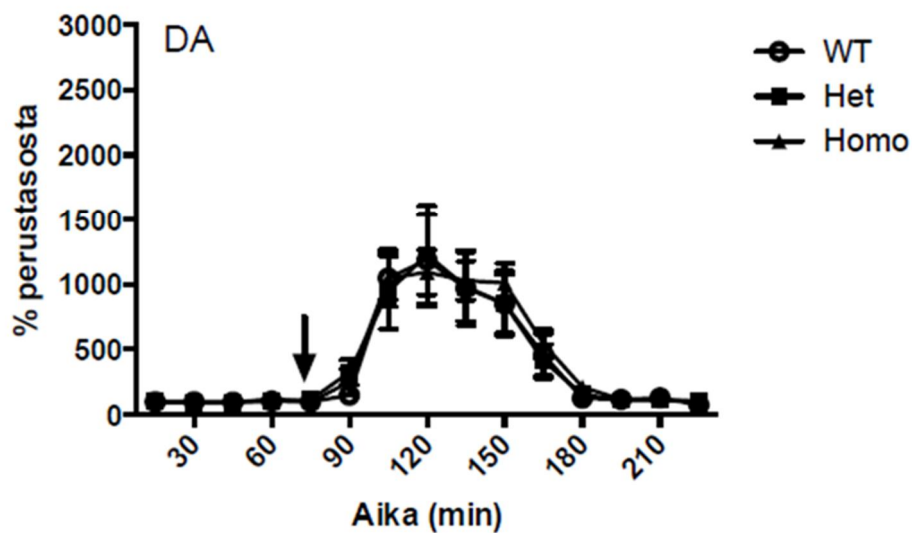


### Amfetamiini 1. annostelu



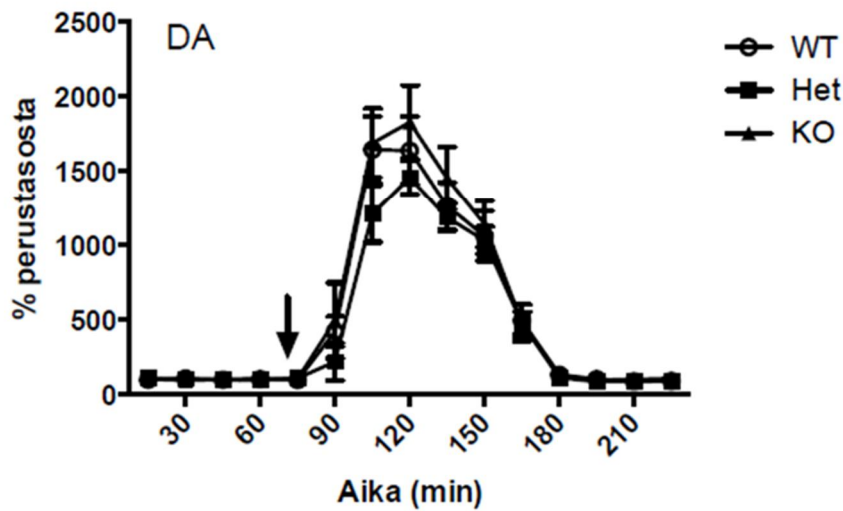
Kuva 8: Amfetamiinistimulaation (100  $\mu$ M, 60 min) vaikutus solunulkoiseen dopamiinipitoisuuteen MEN2B-hiirillä ensimmäisen annostelukerran jälkeen mikrodialyysillä mitattuna. Amfetamiinin annostelun aloitus on merkitty nuolella. N(Wt)=6, n(Het)=9, n(Homo)=9. Pitoisuudet on merkitty prosentuaalisena muutoksena perustasosta.

### Amfetamiini 4. annostelu



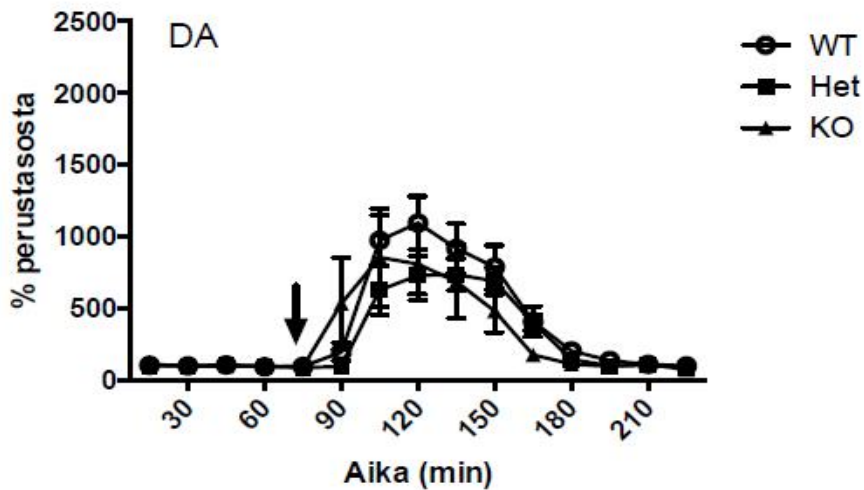
Kuva 9: Amfetamiinistimulaation (100  $\mu$ M, 60 min) vaikutus solunulkoiseen dopamiinipitoisuuteen MEN2B-hiirillä toistetun annostelun jälkeen mikrodialyysillä mitattuna. Amfetamiinin annostelun aloitus on merkitty nuolella. N(Wt)=7, n(Het)=10, n(Homo)=11. Pitoisuudet on merkitty prosentuaalisena muutoksena perustasosta.

### Amfetamiini 1. annostelu



Kuva 10: Amfetamiinistimulaation (100  $\mu$ M, 60 min) vaikutus solunulkoiseen dopamiinipitoisuuteen GDNF-cKO-hiirillä ensimmäisen annostelukerran jälkeen mikrodialyysillä mitattuna. Amfetamiinin annostelun aloitus on merkitty nuolella. N(Wt)=12, n(Het)=10, n(KO)=8. Pitoisuudet on merkitty prosentuaalisena muutoksena perustasosta.

### Amfetamiini 4. annostelu



Kuva 11: Amfetamiinistimulaation (100  $\mu$ M, 60 min) vaikutus solunulkoiseen dopamiinipitoisuuteen GDNF-cKO-hiirillä toistetun annostelun jälkeen mikrodialyysillä mitattuna. Amfetamiinin annostelun aloitus on merkitty nuolella. N(Wt)=11, n(Het)=8, n(KO)=4. Pitoisuudet on merkitty prosentuaalisena muutoksena perustasosta.

### 3.3 Dopamiinin metaboliitit ja 5-HIAA

Dopamiinin metaboliitin DOPAC:n pitoisuuksissa havaittiin muutoksia sekä MEN2B-että GDNF-cKO-hiirillä. DOPAC-pitoisuudet laskivat molempien mikrodialyysikokeiden aikana amfetamiinistimulaation aloituksen jälkeen yhtenäisesti kaikilla genotyypeillä molemmilla hiirikannoilla noin 50 %:iin perustasosta (Liitteet 3,4,5 ja 6). Mittauksen loppuvaiheessa pitoisuudet palautuivat takaisin perustasolle. DOPAC-pitoisuudessa ei kuitenkaan tapahtunut suuria muutoksia mikrodialyysipäivien välillä.

HVA:n pitoisuus pysyi tasaisena (data ei näkyvillä). 5-HIAA:n pitoisuuksia ei analysoitu tarkemmin, koska sillä ei oletettavasti ole suurta merkitystä kokeen tuloksen kannalta. Se on serotoniinin metaboliitti, mutta sen solunulkoisen pitoisuuden vaihtelu kuvaa huonosti muutoksia aivojen serotonergisen järjestelmän toiminnassa (Sharp ym. 1989). 5-HIAA soveltuukin paremmin kuvaamaan solun sisäisiä metaboliatapahtumia.

### 3.4 Aivoleikkeet

Liitteissä 1 ja 2 on esitetty mikrodialyysikoettimien paikat aivoleikkeissä hiirten dorsaalissa striatumissa. Lopullisiin tuloksiin otettiin mukaan ainoastaan hiiret, joiden koettimien paikat oli varmistettu oikeiksi.

## 4 POHDINTA

GDNF:llä uskotaan olevan merkittävä rooli humeriippuvuuden kehittymisessä ja sen uskotaan ehkäisevän plastisia muutoksia aivoissa. Tämän takia nyt tehdyssä tutkimuksessa pyrittiinkin tarkemmin selvittämään GDNF:n roolia striatumiin päätyvien dopamiinihermosolujen plastisuudessa kahdella GDNF:n suhteen erilaisella

muuntogeenisellä hiirikannalla, joiden dopamiinin vapautumista stimuloitiin amfetamiinilla. Saadut tulokset osoittavat, että vaikka amfetamiini nosti selvästi striatumin solunulkoisia dopamiinipitoisuuksia kummallakin hiirikannalla, ei pitoisuuksissa ollut tilastollisesti merkitseviä eroja genotyyppien välillä. Tulokset olivat myös samansuuntaisia molemmilla kokeessa käytetyillä hiirikannoilla. Tämän tutkimuksen tulosten perusteella vaikuttaisikin siltä, että GDNF:llä ei ole merkittävää roolia toistettuun amfetamiiniannosteluun liittyvän plastisuuden kehittämisessä striatumissa. Molemmilla hiirikannoilla oli kuitenkin näkyvissä selvä päiväefekti ensimmäisen ja toisen mikrodialyysin välillä: dopamiinipitoisuudet jäivät selvästi matalammalle tasolle toisena mikrodialyysipäivänä ensimmäiseen verrattuna. Tämä on merkki merkittävästä toleranssin kehittämisestä amfetamiinille, mutta myöskään siinä ei havaittu eroja genotyyppien välillä.

Toleranssin sijaan kyseessä saattaa olla kuitenkin myös kokeen suoritusmenetelmän aiheuttama harha. Koettimen ympärille on esimerkiksi saattanut mittauspäivien välillä kehittyä gliosia, mikä vähentää dialyysipinta-alaa ja voi vaikeuttaa mikrodialyysikoettimen toimintaan puoliläpäisevänä kalvona. Toisaalta DOPAC-pitoisuuksissa ei kuitenkaan voitu havaita vastaavanlaista muutosta päivien välillä, vaan ne pysyivät suhteellisen tasaisina läpi koko kokeen. On myös mahdollista että eri genotyyppien väliset erot ovat niin pieniä, ettei mikrodialyysin tarkkuus riitä havaitsemaan niitä.

DOPAC-pitoisuudet laskivat molemmilla hiirikannoilla tasaisesti amfetamiinin annostelun jälkeen. Tämä oli oletettua, sillä amfetamiini on monoamiinioksidaasin (MAO) kilpaileva ja reversiibeli estäjä, eli se estää MAO:a metaboloimasta dopamiinia DOPAC:ksi (Sulzer ym. 2005). Lisäksi suurin osa DOPAC:sta on todennäköisesti peräisin solunsisäisen dopamiinin metaboliasta, ja sytoplasman DOPAC:n pitoisuus on pienentynyt dopamiinin lisääntyneen vapautumisen takia.

HVA on DOPAC:n sekundaarinen metaboliitti, eli sen pitoisuuksien tulisi olla samassa linjassa DOPAC:n pitoisuuksien kanssa. Suuret muutokset HVA:n pitoisuuksissa kokeen aikana voivat viitata kokeen epäonnistumiseen esimerkiksi paikaltaan liikkuneen mikrodialyysikoettimen takia. Suuria pitoisuusvaihteluja ei nyt suoritetuissa kokeissa kuitenkaan havaittu.

#### 4.1 MEN2B-hiiret

Jatkuvasti aktiivisen Ret-signaloinnin uskotaan suojaavan dopaminergisiä hermosoluja, koska GDNF:n hermosoluja suojaavat vaikutukset välittyvät ainakin osin sen kautta substantia nigraassa (Mijatovic ym. 2011). Tämän perusteella tutkimuksen hypoteesina olikin oletus, että Ret-signaloinnin jatkuva aktiivisuus suojaisi MEN2B-hiiriä amfetamiinin vaikutuksilta ja toleranssin kehittymiseltä. Tätä vaikutusta ei kuitenkaan havaittu, joten tämän tutkimuksen perusteella genotyyppien välillä ei ole havaittavaa eroa striatumien plastisuudessa.

Tulosten perusteella ei kuitenkaan voida varmuudella sanoa, mikä GDNF:n rooli plastisuudessa lopulta on. Jatkuvasti aktiivinen Ret-signaali MEN2B-hiirillä vastaa hyvin huonosti elimistön normaalia fysiologista tilaa, eli suoria vertailuja ei voida tehdä. Lisäksi hiirillä on pistemutaatio Ret-geenissä jo varhaisesta alkiokehityksen vaiheesta lähtien, minkä takia niille on saattanut kehittyä useitakin mekanismeja, joilla ne pyrkivät kumoamaan Ret-aktiivisuuden aiheuttamat muutokset dopamiinin vapautumisessa ja lisääntyneessä kudospitoisuudessa (Smith-Hicks ym. 2000; Mijatovic ym. 2007; Mijatovic ym. 2008). Todennäköisyyttä kompensatoristen mekanismien kehittymiseen lisää se, että GDNF-signaali on erittäin tärkeässä asemassa alkiokehityksen eri vaiheissa.

Tämän hetkisen tiedon mukaan sekä dopamiinin takaisinotto että varastoituminen hermopäätteisiin on tehostunutta MEN2B-hiirillä (Mijatovic ym. 2007; Mijatovic ym. 2008). Mijatovic ym. (2007) määrittivät MEN2B-hiirten striatumista kohonneet dopamiinipitoisuudet, minkä on seurauksena myös DAT:n määrä on lisääntynyt samalla alueella. Oletusta tukee se, että MEN2B-hiiret olivat samassa tutkimuksessa villityypin hiiriä herkempiä kokaiinin vaikutuksille liikeaktiivisuuskokeessa. Lisäksi on viitteitä siitä, että myös dopamiinin varastointi varastorakkuloihin olisi lisääntynyt (Mijatovic ym. 2008). Kun MEN2B- ja villityypin hiirille annettiin VMAT2-salpaajaa tetrabenatsiinia, olivat MEN2B-hiiret selvästi herkempiä sen vaikutuksille, mikä viittaa suurentuneisiin, tetrabenatsiinille herkkiin presynaptisiin dopamiinivarastoihin. Solunulkoiset dopamiinipitoisuudet eivät sen sijaan poikkea normaalista osoituksena

aivojen suuresta kyvystä mukautua tilanteeseen (Airavaara ym. 2006; Mijatovic ym. 2008).

Toinen kompensatorinen mekanismi saattaa olla ei-Ret-välitteinen signaointi. MEN2B-hiirillä on mahdollista tutkia vain Ret-välitteisen signaoinnin vaikutusta, mutta koska amfetamiinin vaikutus MEN2B-hiirten aksonipäätteissä ei poikennut villityypin hiiristä, voidaan olettaa että GDNF:n dopamiinihermosoluja suojelevat ominaisuudet välittyvät myös Ret:stä riippumattoman mekanismin avulla. GDNF-perheen ligandeille onkin löydetty Ret-tyrosiinikinaasireseptorin lisäksi dopaminergisessä järjestelmässä myös useampia vaihtoehtoisia reseptoreja, kuten esimerkiksi neuronaalinen solujen adheesiomolekyyl (NCAM) (Chao ym. 2003; Paratcha ym. 2003).

NCAM osallistuu hermostossa useiden toimintojen kuten hermosolujen kasvun ja synaptisen plastisuuden säätelyyn (Crossin ja Krushel 2000; Rønn ym. 2000). Nämä vaikutukset perustuvat NCAM:n osallisuuteen sekä signaalivälityksessä että solujen adheesiossa. GFR $\alpha$ 1:n ja NCAM:n vuorovaikutus vähentää NCAM:n lisäämää solujen adheesiota ja edistää GDNF:n sitoutumista NCAM:n p140<sup>NCAM</sup>-isomuotoon (Paratcha ym. 2003). Tämä aktivoi nopeasti Src-perheeseen kuuluvien sytoplasmisten tyrosiinikinaasien Fyn:in ja FAK:n soluissa, joista Ret puuttuu. Muissa tutkimuksissa NCAM:n aktivaation on myös osoitettu johtavan fibroplastisen kasvutekijäreseptorin (FGFR) ja tyrosiinifosfataasien aktivaatioon (Saffell ym. 1997).

GDNF:n on kuitenkin todettu edistävän myös GABA:a vapauttavien alkioakautisten hermosolujen erilaistumista ja vaeltamista, vaikka niistä puuttuu kokonaan sekä Ret että NCAM. Tämä viittaakin vielä muiden vaihtoehtoisten signaalireittien olemassaoloon (Perrinjaquet ym. 2011).

Kolmessa äskettäin julkaistussa tutkimuksessa GDNF:lle ehdotetaan mahdollisiksi vaihtoehtoisiksi reiteiksi Ret:n ja NCAM:n lisäksi hepariinisulfaatti proteoglykaani syndekaiini-3:sta, Met-reseptorityrosiinikinaasia ja integriini- $\beta$ :a (Cao ym. 2008; Bessalov ym. 2011; Perrinjaquet ym. 2011). Bessalov ym. (2011) tutkimuksessa GDNF, neurturiini ja artemiini sitoutuivat aivoista eristetyn syndekaiini-3:n hepariinisulfaattiketjuun, minkä perusteella syndekaiini-3 voisi olla niiden luontainen sitoutumisreseptori. Cao ym. (2008) puolestaan havaitsivat, että myös

keskushermostossa esiintyvä solukalvonläpäisevä adheesiomolekyyli integriini- $\beta$  säätelee GDNF:n signalointia. Sen on myös useissa aikaisemmissa tutkimuksissa osoitettu lisäävän solujen lisääntymistä, erilaistumista ja selviytymistä (Giancotti 1997; Cordes ym. 2006).

Lukuisat eri signaalinvälitysmahdollisuudet vähentävätkin pelkän Ret-signaloinnin merkitystä, mikä osaltaan vaikeuttaa tulosten tulkintaa. Jatkuvastikaan aktiivinen reseptori ei välttämättä riitä tuomaan GDNF:n hermosolujen suojaavia vaikutuksia esille, mikäli muiden mekanismien toiminta vastaavasti vähenee. Lisäksi GDNF:n toiminta ylipäättensä on edelleen varsin huonosti tunnettu.

Toisaalta nyt saadut tulokset ovat yhteneviä kokaiinilla tehdyn tutkimuksen kanssa, minkä takia niitä ei voida pitää kovin yllättävinä (Mijatovic ym. 2008). Mijatovic ym. (2008) tutkimuksessa MEN2B-hiirillä genotyyppillä ei ollut vaikutusta kokaiinin aiheuttamaan dopamiinipitoisuuden nousuun mikrodialyysissä. Syyksi epäiltiin tällöin tehostunutta takaisinottoa. Samassa tutkimuksessa genotyyppien välinen ero saatiin kuitenkin näkyviin *in vivo* -voltammetrialla. Siinä 30 Hz stimulaatiolla kokaiini nosti dopamiinipitoisuutta selvästi enemmän MEN2B-hiirillä villityyppiin verrattuna. Koska amfetamiini kääntää DAT:n toiminnan ja lisää dopamiinin vapautumista kokaiinia voimakkaammin, olisi mahdollisten erojen voinut olettaa tulevan nyt selvemmin näkyviin. Eroja ei kuitenkaan havaittu, eli ilmeisesti hiirten kompensatoriset mekanismit pystyvät joko kumoamaan myös amfetamiinin vaikutuksen tai erojen havaitsemiseen tulisi käyttää voltammetriaa.

#### 4.2 GDNF-cKO-hiiret

GDNF:n hermosoluja suojaavan vaikutuksen takia oletettiin, että GDNF:n poisto keskushermostosta altistaisi hiiret amfetamiinin vaikutukselle ja ne herkistyisivät voimakkaammin huumaavaa ainetta kohtaan. Tämä taas olisi mahdollista todeta dopamiinin vapautumisen vähenemisenä. Striatumin dopamiinivasteessa ei kuitenkaan ollut merkitsevää eroa genotyyppien välillä, eli ainakaan mikrodialyysin perusteella GDNF-cKO-hiirten reagointi amfetamiinille ei eroa villityypin hiiristä GDNF:n

puuttumisesta huolimatta. GDNF:n poisto ei siis nyt tehdyn tutkimuksen perusteella altistanut plastisten muutosten syntymiselle striatumissa.

Tulosten varmistamiseksi ja GDNF:n poiston laajemman ymmärtämisen takia tutkimus olisi kuitenkin hyvä toistaa muilla aivoalueilla, erityisesti akkumbens-tumakkeessa. Tulosten vertaaminen aikaisempiin ei nimittäin tällä hetkellä ole mahdollista, sillä tutkimuksessa käytetty GDNF:n suhteen konditionaalinen poistogeeninen hiirikanta on aivan uusi eläinmalli, eikä sillä ole aikaisemmin tehty mitään vastaavanlaisia tutkimuksia. Saadut tulokset antavatkin uutta tietoa GDNF-cKO-hiirten dopamiinijärjestelmän toiminnasta, ja niitä voidaan hyödyntää tutkimuksissa jatkossa.

Useissa aikaisemmissa tutkimuksissa on kuitenkin käytetty heterotsygoottisia GDNF-poistogeenisiä hiiriä (GDNF<sup>+/-</sup>), kun on tutkittu GDNF:n puutoksen merkitystä huumaavien aineiden vaikutukseen (Airavaara ym. 2004; Airavaara ym. 2006; Airavaara ym. 2007). Tilastollisesti merkitseviä eroja genotyyppien välillä ei havaittu kokaiinilla niin liikeaktiivisuutta mittaavassa kokeessa kuin striatumin ja akkumbens-tumakkeen mikrodialyysillääkään (Airavaara ym. 2004). Tämä on samassa linjassa nyt saatujen tulosten kanssa, sillä heterotsygoottisesti poistogeenisten hiirien vaste ei tässäkään tutkimuksessa eronnut muista genotyypeistä.

GDNF<sup>+/-</sup> -hiirillä mitattiin kuitenkin kohonneet solunulkoiset dopamiinipitoisuudet niin caudate putamenissa kuin akkumbens-tumakkeessakin (Airavaara ym. 2004). Lisääntynyt dopamiinin vapautuminen saattaisi olla kompensatorinen mekanismi GDNF:n puutteelle, sillä dopamiinin on esitetty lisäävän GDNF:n synteesiä D1-reseptorin kautta (Ohta ym. 2003). Toisaalta cKO-hiirten striatumin dopamiinipitoisuus ei poikkea normaalista, eli kompensatio ei ainakaan niillä välity dopamiinisynteesin kautta (Andressoo ym. julkaisematon tulos 2012). GDNF:n puuttuminen saattaa kuitenkin voimistaan esimerkiksi ei-Ret-välitteistä signaalointia, jota GDNF normaalisti estää, ja aiheuttaa myös muita kompensatorisia muutoksia. Tällaisista muutoksista on saatu jo alustavia tutkimustuloksia (Andressoo ym. julkaisematon 2012), ja ne voivat vaikuttaa myös amfetamiinivasteisiin. MEN2B-hiirien tapaan voidaankin siis olettaa kompensatoristen mekanismien vaikutuksen olevan suuri sekä cKo- että GDNF<sup>+/-</sup> -hiirillä, kun GDNF:n poisto on tapahtunut jo alkiokehityksen aikana



### 4.3 Käytettyjen menetelmien vaikutukset

Tulkittaessa tutkimuksen tuloksia on huomioitava myös käytettyjen tutkimusmenetelmien mahdollinen vaikutus tuloksiin. Mikrodialyysi on yksi mahdollinen vaihtelun aiheuttaja. Mikrodialyysin hyviä puolia ovat mahdollisuus toistuvaan näytteiden keräämiseen useiden tuntien aikavälillä niin lääkeaineen annostelun kuin eliminaation aikana, sekä käytettävien koe-eläinten määrän pysyminen pienempänä, kun koe voidaan toistaa samoilla eläimillä (de Lange ym. 2000). Annostelemalla lääkeaine suoraan tutkittavalle alueelle mikrodialyysikoettimen kautta, vältetään myös erityisesti huumaavien aineiden aiheuttamat systeemiset vaikutukset, jotka voivat hankaloittaa paikallisten vaikutusten tulkintaa. Koe voidaan suorittaa lisäksi vapaasti liikkuvilla eläimillä, mikä poistaa anestesia-aineen mahdolliset vaikutukset tuloksiin.

Menetelmässä on kuitenkin myös ongelmia. Useat tekijät kuten perfuusioliuoksen koostumus ja lämpötila sekä virtausnopeus saattavat vaikuttaa dialyysiliuoksesta *in vivo* kerättäviin välittäjäainepitoisuuksiin (de Lange ym. 2000). Suhteellisen paksun (2 mm) mikrodialyysikoettimen paikalleen asettaminen aiheuttaa väistämättä jonkin verran kudostuhoa hiiren keskushermostossa joko stereotaktisen leikkauksen aikana tai itse mikrodialyysissä, mikä saattaa vaikuttaa tuloksiin. Kudostuhon todennäköisyyttä lisää mikrodialyysin toistaminen samoille hiirille. Mikrodialyysin aikaresoluutio on myös suhteellisen huono, sillä näytteitä kerätään kokeesta riippuen noin 15–30 minuutin välein riittävän näytemäärän takaamiseksi. Tämän takia nopeat muutokset tutkittavan välittäjäaineen pitoisuudessa voivat jäädä huomaamatta.

On myös otettava huomioon, että lääkeaineena käytetty amfetamiini on myös itsessään neurotoksinen aine (Miller ja O'Callaghan 1996; Cadet ym. 2007). Neurotoksisuuden mekanismi on vielä suurilta osin tuntematon, mutta sen oletetaan perustuvan ainakin kohonneeseen solunulkoiseen dopamiinipitoisuuteen, joka lisää reaktiivisten happiradikaalien muodostumista sekä aktivoi p53-riippuvaisen solukuolemareitin (Cadet ym. 2007). Nyt mikrodialyysin aikana annettu amfetamiinistimulaatio (100  $\mu$ M, 60 min) oli myös suhteellisen voimakas. Toisaalta toksisuutta tutkittaessa käytetyt annokset ovat olleet huomattavasti suurempia (Miller ja O'Callaghan 1996). Sen sijaan

mikrodialyysipäivien välinen amfetamiiniannos (1 mg/kg i.p.) oli melko matala, ja sitä annosteltiin ainoastaan kaksi kertaa. Onkin mahdollista, etteivät annos ja annostelupäivien määrä olleet riittäviä herkistymisen kehittymiselle. Pidempi seurantajakso ja nostetut i.p.-annokset saattaisivatkin sen sijaan tuoda erilaisia tuloksia. Tutkimalla amfetamiinin vaikutusta useammalla eri annosvahvuudella saataisiin myös tietoa optimaalisesta annoksesta sekä annosvasteesta.

GDNF-cKO-hiirillä tehdyissä kokeissa käytettiin uroshiirten ohella myös naaraita. Niillä saadut tulokset olivat kuitenkin samassa linjassa uroksilla saatujen tulosten kanssa, minkä takia naaraiden käytöllä tuskin on vaikutusta tulosten luotettavuuteen.

#### 4.4 Tulosten soveltaminen

Nyt saadut tulokset antavat tarpeellista lisätietoa käytettyjen hiirikantojen ominaisuuksista ja reagoinnista huumausaineannostelulle, ja niitä voidaan jatkossa hyödyntää tehtäessä vastaavanlaisia kokeita samoilla hiirikannoilla. Niistä on hyötyä myös vertailtaessa tuloksia vastaaviin muilla hiirikannoilla, kuten GDNF:ä yli-ilmentävällä hypermorfisella hiirikannalla sekä BDNF-poistogeenisillä hiirillä tehtyihin kokeisiin.

Huumeaddiktion kannalta nyt tutkimuksen kohteena ollut striatum ei kuitenkaan ole kaikkein oleellisin aivoalue, sillä huumaavien aineiden kuten morfiinin ja amfetamiinin mielihyvää tuottavat vaikutukset välittyvät pääasiassa akkumbens-tumakkeeseen ja mediaaliseen etuaivokuoreen johtavan mesokortikolimbisen dopamiiniradaston kautta. Nyt tutkittu mesokortikaaliseen radastoon kuuluva striatum puolestaan välittää lähinnä näiden lääkeaineiden motoriset vaikutukset.

Koska akkumbens-tumaketta pidetään siis varsinaisena addiktion ilmenemispaikkana, olisi sekä MEN2B- että GDNF-cKO-hiirikannoilla kannattavaa tehdä vielä uusi vastaavanlainen tutkimus, jossa mikrodialyysi suoritettaisiin akkumbens-tumakkeen alueella. Tällöin voitaisiin paremmin nähdä mahdollinen genotyyppien välinen ero

toleranssin tai herkistymisen kehittämisessä. Vertailuun olisi mielenkiintoista ottaa myös muita riippuvuutta aiheuttavia lääkeaineita kuten morfiini tai kokaiini.

Toisaalta tulosten soveltamisen myös yleisemmällä tasolla on mahdollista, sillä huumeaddiktion ohella hermokasvutekijöitä on tutkittu lukuisissa muissakin neurologisissa sairauksissa ja oireyhtymissä.

## 5 YHTEENVETO

Huumausaineriippuvuuden taustalla olevat mekanismit ovat vielä osittain huonosti tunnettuja, mikä hankaloittaa myös uusien lääkeainemolekyylien kehittämistä. Gliasolulinjaperäinen hermokasvutekijä GDNF on kuitenkin osoittautunut lupaavaksi mahdollisuudeksi, sillä se vaikuttaa suojaavan addiktion kehittämiseltä. Sillä on saatu lupaavia tuloksia myös useiden neurodegeneratiivisten sairauksien tutkimuksessa, sekä myös kliinisissä kokeissa.

Koska myös GDNF:n vaikutus addiktion kehittämisessä on epäselvä, oli tämän tutkimuksen perimmäisenä tarkoituksena selvittää GDNF:n toimintamekanismia ja roolia striatumin dopamiinihermosolujen toiminnassa, sekä sitä suojaako se mahdollisesti addiktion kehittämiseltä ja huumausaineiden vaikutukselta. Lisäksi tutkittiin Ret-signaaloinnin vaikutusta. Tutkimus suoritettiin kahdella toisistaan poikkeavalla hiirikannalla: MEN2B-hiirillä, joiden Ret-signaali on jatkuvasti aktiivinen, ja GDNF-cKo-hiirillä, joilta puuttuu GDNF keskushermostosta.

Kokeissa saatujen tulosten perusteella genotyypillä ei kuitenkaan ollut vaikutusta amfetamiinin aikaansaamaan dopamiinivasteeseen kummassakaan tutkituista hiirikannoissa. Myöskään kantojen välillä ei ollut eroa. Dopamiinipitoisuuden nousu dorsaalissa striatumin oli kuitenkin selvästi vähäisempää kaikilla genotyypeillä neljännen amfetamiiniannostelun jälkeen. Tämä kertoo todennäköisesti merkittävän toleranssin kehittämisestä amfetamiinille, vaikka myös mahdolliset koejärjestelyn aiheuttamat vaikutukset on otettava huomioon.

Tämä tutkimus ei siis ainakaan striatumin osalta juuri tue näkemystä, jonka mukaan GDNF ehkäisisi huumausaineiden aiheuttamia plastisia muutoksia: sen enempää GDNF:n puuttuminen keskushermostosta kuin sen reseptorin jatkuva aktiivisuuskaan ei vaikuttanut tuloksiin kumpaankin suuntaan. Koska GDNF:llä on kuitenkin aikaisemmin havaittu potentiaalisesti hermosoluja suojaavaa vaikutusta kliinisissäkin kokeissa, on tutkimuksia syytä jatkaa. Erot genotyyppien välillä saattavat olla myös niin pieniä, ettei mikrodialyysin tarkkuus riitä niiden havaitsemiseen.

Jatkossa kokeet tulisi toistaa molemmilla hiirikannoilla akkumbens-tumakkeen alueella. Amfetamiinin annokseen sekä kokeen pituuteen tulisi myös kiinnittää huomiota ja harkita eri annosryhmiä annosvasteen selvittämiseksi.

## KIRJALLISUUSLUETTELO

Airaksinen MS ja Saarma M: The gdnf family: Signaling, biological functions and therapeutic value. *Nat. Rev. Neurosci.* 3: 383-394, 2002.

Airavaara M, Planken A, Gäddnäs H, Piepponen TP, Saarma M ja Ahtee L: Increased extracellular dopamine concentrations and FosB/ $\Delta$ FosB expression in striatal brain areas of heterozygous GDNF knockout mice. *Eur.J.Neurosci.* 20: 2336-2344, 2004.

Airavaara M, Mijatovic J, Vihavainen T, Piepponen TP, Saarma M ja Ahtee L: In heterozygous GDNF knockout mice the response of striatal dopaminergic system to acute morphine is altered. *Synapse* 59: 321-329, 2006.

Airavaara M, Tuomainen H, Piepponen TP, Saarma M ja Ahtee L: Effects of repeated morphine on locomotion, place preference and dopamine in heterozygous glial cell line-derived neurotrophic factor knockout mice. *Genes Brain Behav.* 6: 287-298, 2007.

Airavaara M, Pickens CL, Stern AL, Wihbey KA, Harvey BK, Bossert JM, Liu Q, Hoffer BJ ja Shaham Y: Endogenous GDNF in ventral tegmental area and nucleus accumbens does not play a role in the incubation of heroin craving. *Addiction Biology* 16: 261-272, 2011.

Åkerud P, Canals JM, Snyder EY ja Arenas E: Neuroprotection through Delivery of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor by Neural Stem Cells in a Mouse Model of Parkinson's Disease. *J. Neurosci.* 21: 8108-8118, 2001.

Amenta F, Bronzetti E, Cantalamessa F, El-Assouad D, Felici L, Ricci A ja Tayebati SK: Identification of dopamine plasma membrane and vesicular transporters in human peripheral blood lymphocytes. *J.Neuroimmunol.* 117: 133-142, 2001.

Attwell D, Miller B ja Sarantis M: Arachidonic acid as a messenger in the central nervous system. *Seminars in Neuroscience* 5: 159-169, 1993.

Batchelor M ja Schenk JO: Protein Kinase A Activity May Kinetically Upregulate the Striatal Transporter for Dopamine. *J. Neurosci.* 18: 10304-10309, 1998.

Bauman AL, Apparsundaram S, Ramamoorthy S, Wadzinski BE, Vaughan RA ja Blakely RD: Cocaine and Antidepressant-Sensitive Biogenic Amine Transporters Exist in Regulated Complexes with Protein Phosphatase 2A. *J. Neurosci.* 20: 7571-7578, 2000.

Berridge KC: The debate over dopamine's role in reward: the case for incentive salience. *Psychopharmacology (Berl.)* 191: 391-431, 2007.

Bespalov MM, Sidorova YA, Tumova S, Ahonen-Bishopp A, Magalhães AC, Kuleskiy E, Paveliev M, Rivera C, Rauvala H ja Saarma M: Heparan sulfate proteoglycan syndecan-3 is a novel receptor for GDNF, neurturin, and artemin. *J. Cell Biol.* 192: 153-169, 2011.

Beveridge TJR, Smith HR, Nader MA ja Porrino LJ: Abstinence from Chronic Cocaine Self-Administration Alters Striatal Dopamine Systems in Rhesus Monkeys. *Neuropsychopharmacology* 34: 1162-1171, 2009.

Bhaskar LVKS, Thangaraj K, Wasnik S, Singh L ja Raghavendra Rao V: Dopamine Transporter (DAT1) VNTR Polymorphism and Alcoholism in Two Culturally Different Populations of South India. *The American Journal on Addictions* 21: 343-347, 2012.

Bolan EA, Kivell B, Jaligam V, Oz M, Jayanthi LD, Han Y, Sen N, Urizar E, Gomes I, Devi LA, Ramamoorthy S, Javitch JA, Zapata A ja Shippenberg TS: D2 Receptors Regulate Dopamine Transporter Function via an Extracellular Signal-Regulated Kinases 1 and 2-Dependent and Phosphoinositide 3 Kinase-Independent Mechanism. *Molecular Pharmacology* 71: 1222-1232, 2007.

Bossé R, Fumagalli F, Jaber M, Giros B, Gainetdinov RR, Wetsel WC, Missale C ja Caron MG: Anterior Pituitary Hypoplasia and Dwarfism in Mice Lacking the Dopamine Transporter. *Neuron* 19: 127-138, 1997.

Burnette WB, Bailey MD, Kukoyi S, Blakely RD, Trowbridge CG ja Justice JB: Human Norepinephrine Transporter Kinetics Using Rotating Disk Electrode Voltammetry. *Anal.Chem.* 68: 2932-2938, 1996.

Cadet JL, Krasnova IN, Jayanthi S ja Lyles J: Neurotoxicity of substituted amphetamines: Molecular and cellular mechanisms. *Neurotoxicity Research* 11: 183-202, 2007.

Camí J ja Farré M: Drug Addiction. *N.Engl.J.Med.* 349: 975-986, 2003.

Cao J, Yu J, Li C, Sun Y, Yuan H, Wang H ja Gao D: Integrin  $\alpha 1$  is involved in the signaling of glial cell line-derived neurotrophic factor. *J.Comp.Neurol.* 509: 203-210, 2008.

Carlsson A, Waters N, Holm-Waters S, Tedroff J, Nilsson M ja Carlsson ML: Interactions between monoamines, glutamate, and GABA in schizophrenia: new evidence. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 41: 237-260, 2001.

Carneiro AM, Ingram SL, Beaulieu J, Sweeney A, Amara SG, Thomas SM, Caron MG ja Torres GE: The Multiple LIM Domain-Containing Adaptor Protein Hic-5 Synaptically Colocalizes and Interacts with the Dopamine Transporter. *J. Neurosci.* 22: 7045-7054, 2002.

Carnicella S ja Ron D: GDNF - A potential target to treat addiction. *Pharmacol.Ther.* 122: 9-18, 2009.

Caronti B, Antonini G, Calderaro C, Ruggieri S, Palladini G, Pontieri FE ja Colosimo C: Dopamine transporter immunoreactivity in peripheral blood lymphocytes in Parkinson's disease. *J.Neural Transm.* 108: 803-807, 2001.

Carvelli L, Morón JA, Kahlig KM, Ferrer JV, Sen N, Lechleiter JD, Leeb-Lundberg LMF, Merrill G, Lafer EM, Ballou LM, Shippenberg TS, Javitch JA, Lin RZ ja Galli A: PI 3-kinase regulation of dopamine uptake. *J.Neurochem.* 81: 859-869, 2002.

Cass WA, Larson G, Fitzpatrick FA ja Zahniser NR: Inhibitors of arachidonic acid metabolism: effects on rat striatal dopamine release and uptake. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 257: 990-996, 1991.

Chadchankar H, Ihalainen J, Tanila H ja Yavich L: Decreased reuptake of dopamine in the dorsal striatum in the absence of alpha-synuclein. *Brain Res.* 1382: 37-44, 2011.

Chao CC, Ma YL, Chu KY ja Lee EHY: Integrin  $\alpha v$  and NCAM mediate the effects of GDNF on DA neuron survival, outgrowth, DA turnover and motor activity in rats. *Neurobiol.Aging* 24: 105-116, 2003.

Chen N, Reith MEA ja Quick MW: Synaptic uptake and beyond: the sodium- and chloride-dependent neurotransmitter transporter family SLC6. *Pflugers Arch.* 447: 519-531, 2004.

Cheuk DKL, Li SYH ja Wong V: No association between VNTR polymorphisms of dopamine transporter gene and attention deficit hyperactivity disorder in Chinese children. *Am. J. Med. Genet.* 123-125, 2006.

Cilia R, Ko JH, Cho SS, van Eimeren T, Marotta G, Pellecchia G, Pezzoli G, Antonini A ja Strafella AP: Reduced dopamine transporter density in the ventral striatum of patients with Parkinson's disease and pathological gambling. *Neurobiol. Dis.* 39: 98-104, 2010.

Ciliax B, Heilman C, Demchyshyn L, Pristupa Z, Ince E, Hersch S, Niznik H ja Levey A: The dopamine transporter: immunochemical characterization and localization in brain. *J. Neurosci.* 15: 1714-1723, 1995.

Copeland BJ, Vogelsberg V, Neff NH ja Hadjiconstantinou M: Protein kinase C activators decrease dopamine uptake into striatal synaptosomes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 277: 1527-1532, 1996.

Cordes N, Seidler J, Durzok R, Geinitz H ja Brakebusch C: Beta1-Integrin-Mediated Signaling Essentially Contributes to Cell Survival After Radiation-Induced Genotoxic Injury. *Oncogene* 25: 1378-1390, 2006.

Crossin KL ja Krushel LA: Cellular signaling by neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Developmental Dynamics* 218: 260-279, 2000.

Daniels GM ja Amara SG: Regulated Trafficking of the Human Dopamine Transporter. *J. Biol. Chem.* 274: 35794-35801, 1999.

David HN, Ansseau M ja Abraini JH: Dopamine-glutamate reciprocal modulation of release and motor responses in the rat caudate-putamen and nucleus accumbens of "intact" animals. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 50: 336-360, 2005.

Daws LC, Callaghan PD, Morón JA, Kahlig KM, Shippenberg TS, Javitch JA ja Galli A: Cocaine Increases Dopamine Uptake and Cell Surface Expression of Dopamine Transporters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290: 1545-1550, 2002.

de Lange ECM, de Boer AG ja Breimer DD: Methodological issues in microdialysis sampling for pharmacokinetic studies. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 45: 125-148, 2000.

Djamgoz MBA, Cunningham JR, Davenport SL ja Neal MJ: Nitric oxide inhibits depolarization-induced release of endogenous dopamine in the rabbit retina. *Neurosci. Lett.* 198: 33-36, 1995.

Duman RS: A molecular and cellular theory of depression. *Arch. Gen. Psychiatry* 54: 597, 1997.

Dunlop BW ja Nemeroff CB: The role of dopamine in the pathophysiology of depression. *Arch. Gen. Psychiatry* 64: 327-337, 2007.

Eisenhofer G: The role of neuronal and extraneuronal plasma membrane transporters in the inactivation of peripheral catecholamines. *Pharmacol. Ther.* 91: 35-62, 2001.

Eisenhofer G, Åneman A, Friberg P, Hooper D, Fändriks L, Lonroth H, Hunyady B ja Mezey E: Substantial Production of Dopamine in the Human Gastrointestinal Tract. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82: 3864-3871, 1997.

Fischer JF ja Cho AK: Chemical release of dopamine from striatal homogenates: evidence for an exchange diffusion model. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 208: 203-209, 1979.

Fleckenstein AE, Pögiün S, Carroll FI ja Kuhar MJ: Recovery of dopamine transporter binding and function after intrastriatal administration of the irreversible inhibitor RTI-76 [3 beta-(3p-chlorophenyl) tropan-2 beta-carboxylic acid p-isothiocyanatophenylethyl ester hydrochloride]. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 279: 200-206, 1996.

Fleckenstein AE, Haughey HM, Metzger RR, Kokoshka JM, Riddle EL, Hanson JE, Gibb JW ja Hanson GR: Differential effects of psychostimulants and related agents on dopaminergic and serotonergic transporter function. *Eur.J.Pharmacol.* 382: 45-49, 1999.

Fog JU, Khoshbouei H, Holy M, Owens WA, Vaegter CB, Sen N, Nikandrova Y, Bowton E, McMahon DG, Colbran RJ, Daws LC, Sitte HH, Javitch JA, Galli A ja Gether U: Calmodulin Kinase II Interacts with the Dopamine Transporter C Terminus to Regulate Amphetamine-Induced Reverse Transport. *Neuron* 51: 417-429, 2006.

Foster JD, Pananusorn B, Cervinski MA, Holden HE ja Vaughan RA: Dopamine transporters are dephosphorylated in striatal homogenates and in vitro by protein phosphatase 1. *Mol.Brain Res.* 110: 100-108, 2003.

Franklin KBJ ja Paxinos G: *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press., San Diego 1997

Fuke S, Suo S, Takahashi N, Koike H, Sasagawa N ja Ishiura S: The VNTR polymorphism of the human dopamine transporter (DAT1) gene affects gene expression. *The Pharmacogenomics Journal* 1: 152-156, 2001.

Fusar-Poli P, Rubia K, Rossi G, Sartori G ja Balottin U: Striatal Dopamine Transporter Alterations in ADHD: Pathophysiology or Adaptation to Psychostimulants? A Meta-Analysis. *Am.J.Psychiatry* 2012.

Gainetdinov RR, Fumagalli F, Jones SR ja Caron MG: Dopamine Transporter Is Required for In Vivo MPTP Neurotoxicity: Evidence from Mice Lacking the Transporter. *J.Neurochem.* 69: 1322-1325, 1997.

Gainetdinov RR, Wetsel WC, Jones SR, Levin ED, Jaber M ja Caron MG: Role of serotonin in the paradoxical calming effect of psychostimulants on hyperactivity. *Science* 283: 397-401, 1999.

Gash DM, Zhang Z, Ovadia A, Cass W, Yi A, Simmerman L, Russell D, Martin D, Lapchak PA, Collins F, Hoffer BJ ja Gerhardt GA: Functional recovery in parkinsonian monkeys treated with GDNF. *Nature* 380: 252-255, 1996.

Gelernter J, Kranzler HR, Satel SL ja Rao PA: Genetic association between dopamine transporter protein alleles and cocaine-induced paranoia. *Neuropsychopharmacology* 11: 195-200, 1994.

Gether U, Andersen PH, Larsson OM ja Schousboe A: Neurotransmitter transporters: molecular function of important drug targets. *Trends Pharmacol.Sci.* 27: 375-383, 2006.

Ghitza UE, Zhai H, Wu P, Airavaara M, Shaham Y ja Lu L: Role of BDNF and GDNF in drug reward and relapse: A review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 35: 157-171, 2010.

Giancotti FG: Integrin signaling: specificity and control of cell survival and cell cycle progression. *Curr.Opin.Cell Biol.* 9: 691-700, 1997.



Gill SS, Patel NK, Hotton GR, O'Sullivan K, McCarter R, Bunnage M, Brooks DJ, Svendsen CN ja Heywood P: Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease. *Nat.Med.* 9: 589-595, 2003.

Giros B, el Mestikawy S, Godinot N, Zheng K, Han H, Yang-Feng T ja Caron MG: Cloning, pharmacological characterization, and chromosome assignment of the human dopamine transporter. *Molecular Pharmacology* 42: 383-390, 1992.

Giros B, Jaber M, Jones SR, Wightman RM ja Caron MG: Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature* 379: 606-12, 1996.

Glazner GW, Mu X ja Springer JE: Localization of glial cell line-derived neurotrophic factor receptor alpha and c-ret mRNA in rat central nervous system. *J.Comp.Neurol.* 391: 42-49, 1998.

Golden JP, DeMaro JA, Osborne PA, Milbrandt J ja Johnson Jr. EM: Expression of Neurturin, GDNF, and GDNF Family-Receptor mRNA in the Developing and Mature Mouse. *Exp.Neurol.* 158: 504-528, 1999.

Goodwin JS, Larson GA, Swant J, Sen N, Javitch JA, Zahniser NR, De Felice LJ ja Khoshbouei H: Amphetamine and Methamphetamine Differentially Affect Dopamine Transporters in Vitro and in Vivo. *Journal of Biological Chemistry* 284: 2978-2989, 2009.

Gordon I, Weizman R ja Rehavi M: Modulatory effect of agents active in the presynaptic dopaminergic system on the striatal dopamine transporter. *Eur.J.Pharmacol.* 298: 27-30, 1996.

Gordon J ja Barnes NM: Lymphocytes transport serotonin and dopamine: agony or ecstasy? *Trends Immunol.* 24: 438-443, 2003.

Grånäs C, Ferrer J, Loland CJ, Javitch JA ja Gether U: N-terminal Truncation of the Dopamine Transporter Abolishes Phorbol Ester- and Substance P Receptor-stimulated Phosphorylation without Impairing Transporter Internalization. *J. Biol. Chem.* 278: 4990-5000, 2003.

Gu H, Wall SC ja Rudnick G: Stable expression of biogenic amine transporters reveals differences in inhibitor sensitivity, kinetics, and ion dependence. *J. Biol. Chem.* 269: 7124-7130, 1994.

Gulley JM, Doolen S ja Zahniser NR: Brief, repeated exposure to substrates down-regulates dopamine transporter function in *Xenopus* oocytes in vitro and rat dorsal striatum in vivo. *J.Neurochem.* 83: 400-411, 2002.

Gulley JM ja Zahniser NR: Rapid regulation of dopamine transporter function by substrates, blockers and presynaptic receptor ligands. *Eur. J. Pharmacol.* 479: 139-152, 2003.

Haapaniemi TH, Ahonen A, Torniainen P, Sotaniemi KA ja Myllylä VV: [123I]-CIT SPECT demonstrates decreased brain dopamine and serotonin transporter levels in untreated parkinsonian patients. *Movement Disorders* 16: 124-130, 2001.

Hahn MH ja Blakely RD: Monoamine transporter gene structure and polymorphisms in relation to psychiatric and other complex disorders. *The Pharmacogenomics J.* 2, 217–235, 2002.

Hakkarainen P, Metso L ja Salasuo M: Hamppuikäpolvi, sekakäyttö ja doping. Vuoden 2010 huumeekyselyn tuloksia (verkkojulkaisu). *Yhteiskuntapolitiikka* 76: 397-411. 2011 (Viitattu 30.11.2011). Saatavilla internetistä: [www.stakes.fi/yp/2011/4/hakkarainen.pdf](http://www.stakes.fi/yp/2011/4/hakkarainen.pdf)

Hastrup H, Sen N ja Javitch JA: The Human Dopamine Transporter Forms a Tetramer in the Plasma Membrane: Cross-linking of a cysteine in the fourth transmembrane segment is sensitive to cocaine analogs. *J. Biol. Chem.* 278: 45045-45048, 2003.

Hemmings HC,Jr, Girault JA, Nairn AC, Bertuzzi G ja Greengard P: Distribution of protein phosphatase inhibitor-1 in brain and peripheral tissues of various species: comparison with DARPP-32. *J.Neurochem.* 59: 1053-1061, 1992.

Hersch SM, Yi H, Heilman CJ, Edwards RH ja Levey AI: Subcellular localization and molecular topology of the dopamine transporter in the striatum and substantia nigra. *J.Comp.Neurol.* 388: 211-227, 1997.

Hicke L ja Dunn R: Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 19: 141-172, 2003.

Hoffman BJ, Hansson SR, Mezey É ja Palkovits M: Localization and Dynamic Regulation of Biogenic Amine Transporters in the Mammalian Central Nervous System. *Front.Neuroendocrinol.* 19: 187-231, 1998.

Ingram SL ja Amara SG: Arachidonic Acid Stimulates a Novel Cocaine-Sensitive Cation Conductance Associated with the Human Dopamine Transporter. *J. Neurosci.* 20: 550-557, 2000.

Jaber M, Jones S, Giros B ja Caron MG: The dopamine transporter: A crucial component regulating dopamine transmission. *Movement Disorders* 12: 629-633, 1997.

Javitch JA, D'Amato RJ, Strittmatter SM ja Snyder SH: Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 -tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 2173-2177, 1985.

Jayanthi LD, Apparsundaram S, Malone MD, Ward E, Miller DM, Eppler M ja Blakely RD: The *Caenorhabditis elegans* Gene T23G5.5 Encodes an Antidepressant- and Cocaine-Sensitive Dopamine Transporter. *Molecular Pharmacology* 54: 601-609, 1998.

Jones SR, Gainetdinov RR, Wightman RM ja Caron MG: Mechanisms of Amphetamine Action Revealed in Mice Lacking the Dopamine Transporter. *J. Neurosci.* 18: 1979-1986, 1998.

Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ: Basic and Clinical Pharmacology, 11.painos. McGraw-Hill Medical, San Francisco 2009

Keith DJ, Eshleman AJ ja Janowsky A: Melittin stimulates fatty acid release through non-phospholipase-mediated mechanisms and interacts with the dopamine transporter and other membrane spanning proteins. *Eur.J.Pharmacol.* 2010.

Keith DJ, Wolfrum K, Eshleman AJ ja Janowsky A: Melittin initiates dopamine transporter internalization and recycling in transfected HEK-293 cells. *Eur.J.Pharmacol.* 690: 13-21, 2012.

Kilty J, Lorang D ja Amara S: Cloning and expression of a cocaine-sensitive rat dopamine transporter. *Science* 254: 578-579, 1991.

Kiss JP: Role of nitric oxide in the regulation of monoaminergic neurotransmission. *Brain Res.Bull.* 52: 459-466, 2000.

Kiss JP, Zsilla G ja Vizi ES: Inhibitory effect of nitric oxide on dopamine transporters: Interneuronal communication without receptors. *Neurochem.Int.* 4: 485-489, 2004.

Klimek V, Schenck JE, Han H, Stockmeier CA ja Ordway GA: Dopaminergic abnormalities in amygdaloid nuclei in major depression: a postmortem study. *Biol.Psychiatry* 52: 740-748, 2002.

Köhnke MD, Batra A, Kolb W, Köhnke AM, Lutz U, Schick S ja Gaerner I: Association of the dopamine transporter gene with alcoholism. *Alcohol Alcohol.* 40: 339-342, 2005.

Laasonen-Balk T, Kuikka J, Viinamäki H, Husso-Saastamoinen M, Lehtonen J ja Tiihonen J: Striatal dopamine transporter density in major depression. *Psychopharmacology (Berl.)* 144: 282-285, 1999.

Laine TP, Ahonen A, Torniainen P, Heikkilä J, Pyhtinen J, Rasanen P, Niemela O ja Hillbom M: Dopamine transporters increase in human brain after alcohol withdrawal. *Mol.Psychiatry* 4: 189-91, 104-5, 1999a.

Laine TPJ, Ahonen A, Räsänen P ja Tiihonen J: Dopamine transporter availability and depressive symptoms during alcohol withdrawal. *Psychiatry Research: Neuroimaging* 90: 153-157, 1999b.

le Couteur DG, Leighton PW, McCann SJ ja Pond SM: Association of a polymorphism in the dopamine-transporter gene with parkinson's disease. *Movement Disorders* 12: 760-763, 1997.

Lee FJS, LIU F, Pristupa ZB ja Nizhik HB: Direct binding and functional coupling of  $\alpha$ -synuclein to the dopamine transporters accelerate dopamine-induced apoptosis. *The FASEB Journal* 15: 916-926, 2001.

Lee FJS, Pei L, Moszczynska A, Vukusic B, Fletcher PJ ja Liu F: Dopamine transporter cell surface localization facilitated by a direct interaction with the dopamine D2 receptor. *EMBO J.* 26: 2127-2136, 2007.

Lee K, Kim M, Kim D ja Lee Y: Syntaxin 1A and Receptor for Activated C Kinase Interact with the N-Terminal Region of Human Dopamine Transporter *Neurochem.Res.* 29: 1405-1409, 2004.

Li LB, Chen N, Ramamoorthy S, Chi L, Cui XN, Wang LC ja Reith ME: The role of N-glycosylation in function and surface trafficking of the human dopamine transporter. *J.Biol.Chem.* 279: 21012-21020, 2004.

Lin Z, Wang W, Kopajtic T, Revay RS ja Uhl GR: Dopamine Transporter: Transmembrane Phenylalanine Mutations Can Selectively Influence Dopamine Uptake and Cocaine Analog Recognition. *Molecular Pharmacology* 56: 434-447, 1999.

Little KY, Zhang L, Desmond T, Frey KA, Dalack GW ja Cassin BJ: Striatal dopaminergic abnormalities in human cocaine users. *Am.J.Psychiatry* 156: 238-245, 1999.

Loo DDF, Eskandari S, Boorer KJ, Sarkar HK ja Wright EM: Role of Cl<sup>-</sup> in Electrogenic Na<sup>+</sup>-coupled Cotransporters GAT1 and SGLT1. *J. Biol. Chem.* 275: 37414-37422, 2000.

Lorrain DS ja Hull EM: Nitric oxide increases dopamine and serotonin release in the medial preoptic area. *Neuroreport* 5: 87-89, 1993.

Lott DC, Kim SJ, Cook EH ja de Wit H: Dopamine transporter gene associated with diminished subjective response to amphetamine. *Neuropsychopharmacology* 30: 602-609, 2005.

Lu L, Wang X, Wu P, Xu C, Zhao M, Morales M, Harvey BK, Hoffer BJ ja Shaham Y: Role of Ventral Tegmental Area Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor in Incubation of Cocaine Craving. *Biol.Psychiatry* 66: 137-145, 2009.

Madras BK, Miller GM ja Fischman AJ: The dopamine transporter: relevance to attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Behav.Brain Res.* 130: 57-63, 2002.

Maiya R, Buck KJ, Harris RA ja Mayfield RD: Ethanol-sensitive Sites on the Human Dopamine Transporter. *J. Biol. Chem.* 277: 30724-30729, 2002.

Marazziti D, Consoli G, Masala I, Catena Dell'Osso M ja Baroni S: Latest advancements on serotonin and dopamine transporters in lymphocytes. *Mini Rev.Med.Chem.* 10: 32-40, 2010.

Mash DC, Pablo J, Ouyang Q, Hearn WL ja Izenwasser S: Dopamine transport function is elevated in cocaine users. *J.Neurochem.* 81: 292-300, 2002.

Masson J, Sagné C, Hamon M ja Mestikawy SE: Neurotransmitter Transporters in the Central Nervous System. *Pharmacological Reviews* 51: 439-464, 1999.

Mayfield RD, Maiya R, Keller D ja Zahniser NR: Ethanol potentiates the function of the human dopamine transporter expressed in *Xenopus* oocytes. *J.Neurochem.* 79: 1070-1079, 2001.

Meiergerd SM, Patterson TA ja Schenk JO: D2 receptors may modulate the function of the striatal transporter for dopamine: kinetic evidence from studies in vitro and in vivo. *J.Neurochem.* 61: 764-767, 1993.

Melikian HE ja Buckley KM: Membrane Trafficking Regulates the Activity of the Human Dopamine Transporter. *J. Neurosci.* 19: 7699-7710, 1999.

Melikian HE, Ramamoorthy S, Tate CG ja Blakely RD: Inability to N-glycosylate the human norepinephrine transporter reduces protein stability, surface trafficking, and transport activity but not ligand recognition. *Molecular Pharmacology* 50: 266-276, 1996.

Merchant BA ja Madura JD: Insights from molecular dynamics: the binding site of cocaine in the dopamine transporter and permeation pathways of substrates in the leucine and dopamine transporters. *J.Mol.Graph.Model* 38: 1-12, 2012

Methner DNR ja Mayfield RD: Ethanol Alters Endosomal Recycling of Human Dopamine Transporters. *J. Biol. Chem.* 285: 10310-10317, 2010.

Metzger RR, Hanson GR, Gibb JW ja Fleckenstein AE: 3,4-Methylenedioxymethamphetamine-induced acute changes in dopamine transporter function. *Eur.J.Pharmacol.* 349: 205-210, 1998.

Mezey, Eisenhofer G, Hansson S, Harta G, Hoffman BJ, Gallatz K, Palkovits M ja Hunyady B: Non-Neuronal Dopamine in the Gastrointestinal System. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 26: 14-22, 1999.

Mijatovic J, Airavaara M, Planken A, Auvinen P, Raasmaja A, Piepponen TP, Costantini F, Ahtee L ja Saarma M: Constitutive Ret Activity in Knock-In Multiple Endocrine Neoplasia Type B Mice Induces Profound Elevation of Brain Dopamine Concentration via Enhanced Synthesis and Increases the Number of TH-Positive Cells in the Substantia Nigra. *J. Neurosci.* 27: 4799-4809, 2007.

Mijatovic J, Patrikainen O, Yavich L, Airavaara M, Ahtee L, Saarma M ja Petteri Piepponen T: Characterization of the striatal dopaminergic neurotransmission in MEN2B mice with elevated cerebral tissue dopamine. *J.Neurochem.* 105: 1716-1725, 2008.

Mijatovic J, Piltonen M, Alberton P, Männistö PT, Saarma M ja Piepponen TP: Constitutive Ret signaling is protective for dopaminergic cell bodies but not for axonal terminals. *Neurobiol.Aging* 32: 1486-1494, 2011.

Miller GM ja Madras BK: Polymorphisms in the 3'-untranslated region of human and monkey dopamine transporter genes affect reporter gene expression. *Mol.Psychiatry* 1: 44-55, 2002

Miller DB ja O'Callaghan JP: Neurotoxicity of d-Amphetamine in the C57BL/6J and CD-1 Mouse. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 801: 148-167, 1996.

Miranda M, Wu CC, Sorkina T, Korstjens DR ja Sorkin A: Enhanced Ubiquitylation and Accelerated Degradation of the Dopamine Transporter Mediated by Protein Kinase C. *J. Biol. Chem.* 280: 35617-35624, 2005.

Miranda M, Dionne KR, Sorkina T ja Sorkin A: Three Ubiquitin Conjugation Sites in the Amino Terminus of the Dopamine Transporter Mediate Protein Kinase C-dependent Endocytosis of the Transporter. *Mol. Biol. Cell* 18: 313-323, 2007.

Missale C, Nash R, Robinson S, Jaber M ja Caron M: Dopamine Receptors: From Structure to Function. *Physiol. Rev.* 78: 189-225, 1998.

Molinoff PB ja Axelrod J: Biochemistry of Catecholamines. *Annu.Rev.Biochem.* 40: 465-500, 1971.

Moore MW, Klein RD, Farinas I, Sauer H, Armanini M, Phillips H, Reichardt LF, Ryan AM, Carver-Moore K ja Rosenthal A: Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF. *Nature* 382: 76-79, 1996.

Morón JA, Brockington A, Wise RA, Rocha BA ja Hope BT: Dopamine Uptake through the Norepinephrine Transporter in Brain Regions with Low Levels of the Dopamine Transporter: Evidence from Knock-Out Mouse Lines. *J. Neurosci.* 22: 389-395, 2002.

Morón JA, Zakharova I, Ferrer JV, Merrill GA, Hope B, Lafer EM, Lin ZC, Wang JB, Javitch JA, Galli A ja Shippenberg TS: Mitogen-Activated Protein Kinase Regulates Dopamine Transporter Surface Expression and Dopamine Transport Capacity. *J. Neurosci.* 23: 8480-8488, 2003.

Mortensen OV ja Amara SG: Dynamic regulation of the dopamine transporter. *Eur.J.Pharmacol.* 479: 159-170, 2003.

Müller-Vahl KR, Berding G, Brücke T, Kolbe H, Meyer GJ, Hundeshagen H, Dengler R, Knapp WH ja Emrich HM: Dopamine transporter binding in Gilles de la Tourette syndrome. *J.Neurol.* 247: 514-520, 2000.

Muramatsu T ja Higuchi S: Dopamine Transporter Gene Polymorphism and Alcoholism. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 211: 28-32, 1995.

Nirenberg MJ, Chan J, Pohorille A, Vaughan RA, Uhl GR, Kuhar MJ ja Pickel VM: The Dopamine Transporter: Comparative Ultrastructure of Dopaminergic Axons in Limbic and Motor Compartments of the Nucleus Accumbens. *J. Neurosci.* 17: 6899-6907, 1997.

Nosrat CA, Tomac A, Hoffer BJ ja Olson L: Cellular and developmental patterns of expression of Ret and glial cell line-derived neurotrophic factor receptor alpha mRNAs. *Exp.Brain Res.* 115: 410-422, 1997.

Ohta K, Kuno S, Mizuta I, Fujinami A, Matsui H ja Ohta M: Effects of dopamine agonists bromocriptine, pergolide, cabergoline, and SKF-38393 on GDNF, NGF, and BDNF synthesis in cultured mouse astrocytes. *Life Sci.* 73: 617-626, 2003.

Ordway RW, Walsh JV, Jr ja Singer JJ: Arachidonic acid and other fatty acids directly activate potassium channels in smooth muscle cells. *Science* 244: 1176-1179, 1989.

Paratcha G, Ledda F ja Ibáñez CF: The Neural Cell Adhesion Molecule NCAM Is an Alternative Signaling Receptor for GDNF Family Ligands. *Cell* 113: 867-879, 2003.

Parkinsonin tauti. Käypä hoito -suositus. Suomalaisen Lääkäriseuran Duodecimin ja Suomen Neurologisen yhdistyksen asettama työryhmä. Helsinki: Suomalainen Lääkäriseura Duodecim, 2010 (viitattu 5.12.2010). Saatavilla Internetissä: [www.kaypahoito.fi](http://www.kaypahoito.fi)

Pellicano C, Buttarelli FR, Circella A, Tiple D, Giovannelli M, Benincasa D, Colosimo C ja Pontieri FE: Dopamine transporter immunoreactivity in peripheral blood lymphocytes discriminates Parkinson's disease from essential tremor. *J. Neural Transm.* 114: 935-938, 2007.

Perrinjaquet M, Sjöstrand D, Moliner A, Zechel S, Lamballe F, Maina F ja Ibáñez CF: MET signaling in GABAergic neuronal precursors of the medial ganglionic eminence restricts GDNF activity in cells that express GFR $\alpha$ 1 and a new transmembrane receptor partner. *J. Cell Sci.* 124: 2797-2805, 2011.

Pichel JG, Shen L, Sheng HZ, Granholm AC, Drago J, Grinberg A, Lee EJ, Huang SP, Saarma M, Hoffer BJ, Sariola H ja Westphal H: Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF. *Nature* 382: 73-76, 1996.

Pörzgen P, Park SK, Hirsh J, Sonders MS ja Amara SG: The Antidepressant-Sensitive Dopamine Transporter in *Drosophila melanogaster*: A Primordial Carrier for Catecholamines. *Molecular Pharmacology* 59: 83-95, 2001.

Prasad BM ja Amara SG: The Dopamine Transporter in Mesencephalic Cultures Is Refractory to Physiological Changes in Membrane Voltage. *J. Neurosci.* 21: 7561-7567, 2001.

Richards TL ja Zahniser NR: Rapid substrate-induced down-regulation in function and surface localization of dopamine transporters: rat dorsal striatum versus nucleus accumbens. *J. Neurochem.* 108: 1575-1584, 2009.

Ritz MC, Lamb RJ, Goldberg SR ja Kuhar MJ: Cocaine receptors on dopamine transporters are related to self-administration of cocaine. *Science* 237: 1219-1223, 1987.

Robbins TW ja Everitt BJ: Drug addiction: bad habits add up. *Nature* 398: 567-570, 1999.

Robinson DL, Volz TJ, Schenk JO ja Wightman RM: Acute ethanol decreases dopamine transporter velocity in rat striatum: in vivo and in vitro electrochemical measurements. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 29: 746-755, 2005.

Rocha BA: Stimulant and reinforcing effects of cocaine in monoamine transporter knockout mice. *Eur. J. Pharmacol.* 479: 107-115, 2003.

Rocha BA, Fumagalli F, Gainetdinov RR, Jones SR, Ator R, Giros B, Miller GW ja Caron MG: Cocaine self-administration in dopamine-transporter knockout mice. *Nat.Neurosci.* 1: 132-137, 1998.

Rønn LCB, Berezin V ja Bock E: The neural cell adhesion molecule in synaptic plasticity and ageing. *Int. J. Dev. Neurosci.* 18: 193-199, 2000.

Rothblat DS, Rubin E ja Schneider JS: Effects of chronic alcohol ingestion on the mesostriatal dopamine system in the rat. *Neurosci.Lett.* 300: 63-66, 2001.

Sacchetti P, Brownschidle LA, Granneman JG ja Bannon MJ: Characterization of the 5'-flanking region of the human dopamine transporter gene. *Mol.Brain Res.* 74: 167-174, 1999.

Sacchetti P, Mitchell TR, Granneman JG ja Bannon MJ: Nurr1 enhances transcription of the human dopamine transporter gene through a novel mechanism. *J.Neurochem.* 76: 1565-1572, 2001.

Sacchetti P, Carpentier R, Segard P, Olive-Cren C ja Lefebvre P: Multiple signaling pathways regulate the transcriptional activity of the orphan nuclear receptor NURR1. *Nucleic Acids Res.* 34: 5515-5527, 2006.

Saffell JL, Williams EJ, Mason IJ, Walsh FS ja Doherty P: Expression of a dominant negative FGF receptor inhibits axonal growth and FGF receptor phosphorylation stimulated by CAMs. *Neuron* 18: 231-242, 1997.

Sakurada K, Ohshima-Sakurada M, Palmer TD ja Gage FH: Nurr1, an orphan nuclear receptor, is a transcriptional activator of endogenous tyrosine hydroxylase in neural progenitor cells derived from the adult brain. *Development* 126: 4017-4026, 1999.

Salahpour A, Medvedev IO, Beaulieu J, Gainetdinov RR ja Caron MG: Local Knockdown of Genes in the Brain Using Small Interfering RNA: A Phenotypic Comparison with Knockout Animals. *Biol.Psychiatry* 61: 65-69, 2007.

Salahpour A, Ramsey AJ, Medvedev IO, Kile B, Sotnikova TD, Holmstrand E, Ghisi V, Nicholls PJ, Wong L, Murphy K, Sesack SR, Wightman RM, Gainetdinov RR ja Caron MG: Increased amphetamine-induced hyperactivity and reward in mice overexpressing the dopamine transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105: 4405-4410, 2008.

Samadi P, Rouillard C, Bedard PJ ja Di Paolo T: Functional neurochemistry of the basal ganglia. *Handb.Clin.Neurol.* 83: 19-66, 2007.

Sariola H ja Saarma M: Novel functions and signalling pathways for GDNF. *J. Cell Sci.* 116: 3855-3862, 2003.

Sauer B: Inducible Gene Targeting in Mice Using the Cre/loxSystem. *Methods* 14: 381-392, 1998.

Saunders C, Ferrer JV, Shi L, Chen J, Merrill G, Lamb ME, Leeb-Lundberg LMF, Carvelli L, Javitch JA ja Galli A: Amphetamine-induced loss of human dopamine transporter activity: An internalization-dependent and cocaine-sensitive mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 6850-6855, 2000.



Schmitt KC ja Reith MEA: Regulation of the dopamine transporter. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1187: 316-340, 2010.

Seeman P ja Madras BK: Anti-hyperactivity medication: methylphenidate and amphetamine. *Mol.Psychiatry* 3: 386-396, 1998.

Sharp T, Bramwell SR ja Grahame-Smith DG: 5-HT<sub>1</sub> agonists reduce 5-hydroxytryptamine release in rat hippocampus in vivo as determined by brain microdialysis. *Br.J.Pharmacol.* 96: 283-290, 1989.

Slevin JT, Gash DM, Smith CD, Gerhardt GA, Kryscio R, Chebrolu H, Walton A, Wagner R ja Young AB: Unilateral intraputamin glial cell line-derived neurotrophic factor in patients with Parkinson disease: response to 1 year each of treatment and withdrawal. *Neurosurg.Focus.* 20: 1-7, 2006.

Smith-Hicks CL, Sizer KC, Powers JF, Tischler AS ja Costantini F: C-cell hyperplasia, pheochromocytoma and sympathoadrenal malformation in a mouse model of multiple endocrine neoplasia type 2B. *EMBO J.* 19: 612-622, 2000.

Sonders MS, Zhu S, Zahniser NR, Kavanaugh MP ja Amara SG: Multiple Ionic Conductances of the Human Dopamine Transporter: The Actions of Dopamine and Psychostimulants. *J. Neurosci.* 17: 960-974, 1997.

Sora I, Wichems C, Takahashi N, Li X, Zeng Z, Revay R, Lesch K, Murphy DL ja Uhl GR: Cocaine reward models: Conditioned place preference can be established in dopamine- and in serotonin-transporter knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 7699-7704, 1998.

Sora I, Hall FS, Andrews AM, Itokawa M, Li X, Wei H, Wichems C, Lesch K, Murphy DL ja Uhl GR: Molecular mechanisms of cocaine reward: Combined dopamine and serotonin transporter knockouts eliminate cocaine place preference. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 5300-5305, 2001.

Sorkina T, Doolen S, Galperin E, Zahniser NR ja Sorkin A: Oligomerization of Dopamine Transporters Visualized in Living Cells by Fluorescence Resonance Energy Transfer Microscopy. *J. Biol. Chem.* 278: 28274-28283, 2003.

Sotnikova TD, Beaulieu J, Gainetdinov RR ja Caron MG: Molecular Biology, Pharmacology and Functional Role of the Plasma Membrane Dopamine Transporter. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 5: 45-56, 2006.

Sulzer D, Maidment NT ja Rayport S: Amphetamine and Other Weak Bases Act to Promote Reverse Transport of Dopamine in Ventral Midbrain Neurons. *J.Neurochem.* 60: 527-535, 1993.

Sulzer D, Chen T, Lau Y, Kristensen H, Rayport S ja Ewing A: Amphetamine redistributes dopamine from synaptic vesicles to the cytosol and promotes reverse transport. *J. Neurosci.* 15: 4102-4108, 1995.

Sulzer D, Sonders MS, Poulsen NW ja Galli A: Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines: A review. *Prog.Neurobiol.* 75: 406-433, 2005.

Swant J, Goodwin JS, North A, Ali AA, Gamble-George J, Chirwa S ja Khoshbouei H:  $\alpha$ -Synuclein Stimulates a Dopamine Transporter-dependent Chloride Current and Modulates the Activity of the Transporter. *J. Biol. Chem.* 286: 43933-43943, 2011.

Thomas SM, Hagel M ja Turner CE: Characterization of a focal adhesion protein, Hic-5, that shares extensive homology with paxillin. *J. Cell Sci.* 112: 181-190, 1999.

Thompson AC, Zapata A, Justice JB, Vaughan RA, Sharpe LG ja Shippenberg TS:  $\kappa$ -Opioid Receptor Activation Modifies Dopamine Uptake in the Nucleus Accumbens and Opposes the Effects of Cocaine. *J. Neurosci.* 20: 9333-9340, 2000.

Tian L, Karimi M, Loftin SK, Brown CA, Xia H, Xu J, Mach RH ja Perlmutter JS: No Differential Regulation of Dopamine Transporter (DAT) and Vesicular Monoamine Transporter 2 (VMAT2) Binding in a Primate Model of Parkinson Disease. *PLoS One* 7: 314-339, 2012.

Tilley M, Cagniard B, Zhuang X, Han D, Tiao N ja Gu H: Cocaine reward and locomotion stimulation in mice with reduced dopamine transporter expression. *BMC Neuroscience* 8: 42, 2007.

Todd RD, Huang H, Smalley SL, Nelson SF, Willcutt EG, Pennington BF, Smith SD, Faraone SV ja Neuman RJ: Collaborative analysis of DRD4 and DAT genotypes in population-defined ADHD subtypes. *J. Child Psychol. Psychiatry* 46: 1067-1073, 2005.

Torres GE, Yao W, Mohn AR, Quan H, Kim K, Levey AI, Staudinger J ja Caron MG: Functional Interaction between Monoamine Plasma Membrane Transporters and the Synaptic PDZ Domain-Containing Protein PICK1. *Neuron* 30: 121-134, 2001.

Torres GE, Carneiro A, Seamans K, Fiorentini C, Sweeney A, Yao W ja Caron MG: Oligomerization and Trafficking of the Human Dopamine Transporter. *J. Biol. Chem.* 278: 2731-2739, 2003a.

Torres GE, Gainetdinov RR ja Caron MG: Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function. *Nat. Rev. Neurosci.* 4: 13, 2003b.

Ueno S, Nakamura M, Mikami M, Kondoh K, Ishiguro H, Arinami T, Komiyama T, Mitsushio H, Sano A ja Tanabe H: Identification of a novel polymorphism of the human dopamine transporter (DAT1) gene and the significant association with alcoholism. *Mol. Psychiatry* 4: 552-557, 1999.

Usdin TB, Mezey E, Chen C, Brownstein MJ ja Hoffman BJ: Cloning of the cocaine-sensitive bovine dopamine transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 11168-11171, 1991.

Volkow ND: Evaluating Dopamine Reward Pathway in ADHD. *Clinical Implications.* 302: 1084, 2009.

Volkow ND, Ding YS, Fowler JS, Wang GJ, Logan J, Gatley SJ, Hitzemann R, Smith G, Fields SD ja Gur R: Dopamine transporters decrease with age. *J. Nucl. Med.* 37: 554-559, 1996.

Walker JKL, Gainetdinov RR, Mangel AW, Caron MG ja Shetzline MA: Mice lacking the dopamine transporter display altered regulation of distal colonic motility. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 279: G311-G318, 2000.

Wersinger C ja Sidhu A: Attenuation of dopamine transporter activity by  $\alpha$ -synuclein. *Neurosci.Lett.* 340: 189-192, 2003.

Wersinger C, Prou D, Vernier P ja Sidhu A: Modulation of dopamine transporter function by  $\alpha$ -synuclein is altered by impairment of cell adhesion and by induction of oxidative stress. *The FASEB Journal*, 2003.

West AR ja Grace AA: Striatal nitric oxide signaling regulates the neuronal activity of midbrain dopamine neurons in vivo. *J.Neurophysiol.* 83: 1796-1808, 2000.

Wilson JM, Shannak K, Kish SJ, Levey AI, Bergeron C, Deck J, Kalasinsky K, Ang L, Peretti F, Adams VI, Smialek J, Anderson WR ja Niznik HB: Striatal dopamine, dopamine transporter, and vesicular monoamine transporter in chronic cocaine users. *Ann.Neurol.* 40: 428-439, 1996.

Xu M ja Lin Z: Genetic influences of dopamine transport gene on alcohol dependence: A pooled analysis of 13 studies with 2483 cases and 1753 controls. *Prog.Neuro-Psychopharmacol.Biol.Psychiatry* 35: 1255-1260, 2011.

Yamamoto BK ja Novotney S: Regulation of Extracellular Dopamine by the Norepinephrine Transporter. *J.Neurochem.* 71: 274-280, 2002.

Yoshimoto K, Ueda S, Nishi M, Yang Y, Matsushita H, Takeuchi Y, Kato B, Kawai Y, Noritake K, Kaneda S, Sorimachi Y ja Yasuhara M: Changes in Dopamine Transporter and c-Fos Expression in the Nucleus Accumbens of Alcohol-Tolerant Rats. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 24: 361-365, 2000.

Zahm DS: Compartments in rat dorsal and ventral striatum revealed following injection of 6-hydroxydopamine into the ventral mesencephalon. *Brain Res.* 552: 164-169, 1991.

Zahniser NR ja Doolen S: Chronic and acute regulation of Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-dependent neurotransmitter transporters: drugs, substrates, presynaptic receptors, and signaling systems. *Pharmacol.Ther.* 92: 21-55, 2001.

Zahniser NR ja Sorkin A: Rapid regulation of the dopamine transporter: role in stimulant addiction. *Neuropharmacology* 47, Supplement 1: 80-91, 2004.

Zahniser NR, Larson GA ja Gerhardt GA: In Vivo Dopamine Clearance Rate in Rat Striatum: Regulation by Extracellular Dopamine Concentration and Dopamine Transporter Inhibitors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 289: 266-277, 1999.

Zapata A ja Shippenberg TS: D3 receptor ligands modulate extracellular dopamine clearance in the nucleus accumbens. *J.Neurochem.* 81: 1035-1042, 2002.

Zapata A, Kivell B, Han Y, Javitch JA, Bolan EA, Kuraguntla D, Jaligam V, Oz M, Jayanthi LD, Samuvel DJ, Ramamoorthy S ja Shippenberg TS: Regulation of dopamine transporter function and cell surface expression by D3 dopamine receptors. *J.Biol.Chem.* 282: 35842-35854, 2007.

Zhang J, Liu X, Lei X, Wang L, Guo L, Zhao G ja Lin G: Discovery and synthesis of novel luteolin derivatives as DAT agonists. *Bioorg.Med.Chem.* 2010.

Zhang L ja Reith MEA: Regulation of the functional activity of the human dopamine transporter by the arachidonic acid pathway. *Eur.J.Pharmacol.* 315: 345-354, 1996.

Zhao G, Qin G-, Wang J, Chu W ja Guo L-: Functional activation of monoamine transporters by luteolin and apigenin isolated from the fruit of *Perilla frutescens* (L.). *Britt. Neurochem.Int.* 56: 168-176, 2010.

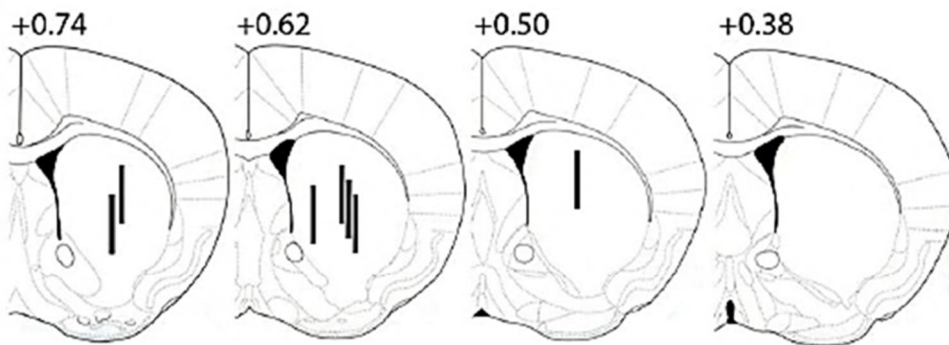
Zhu S, Kavanaugh MP, Sonders MS, Amara SG ja Zahniser NR: Activation of Protein Kinase C Inhibits Uptake, Currents and Binding Associated with the Human Dopamine Transporter Expressed in *Xenopus* Oocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 282: 1358-1365, 1997.

Zhuang X, Oosting RS, Jones SR, Gainetdinov RR, Miller GW, Caron MG ja Hen R: Hyperactivity and impaired response habituation in hyperdopaminergic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 1982-1987, 2001.

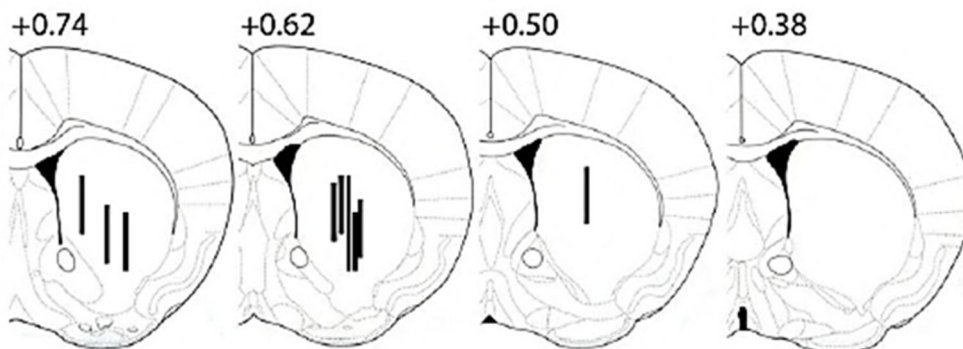
## LIITTEET

Liite 1: Mikrodialyysikoettimien paikat striatumissa MEN2B-hiirillä. Numerot kuvien päällä kertovat etäisyyden bregmasta millimetreinä. Merkit on piirretty lähimpään vastaavaan kuvaan, eikä päällekkäin meneviä kohtia ole merkitty näkyville (Franklin ja Paxinos 1997)

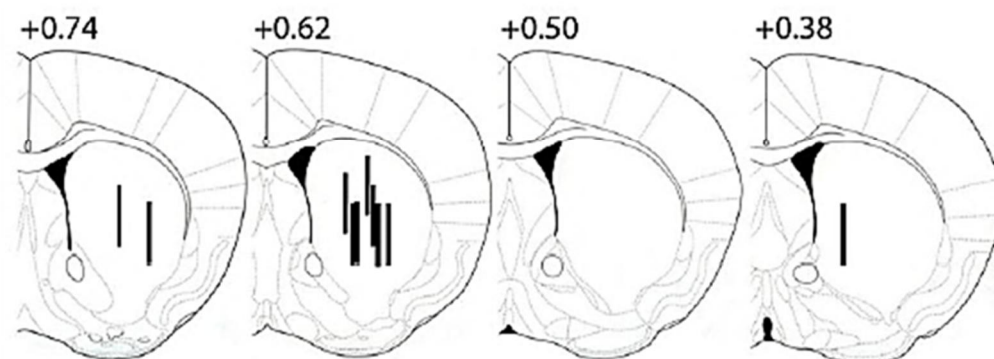
### WT



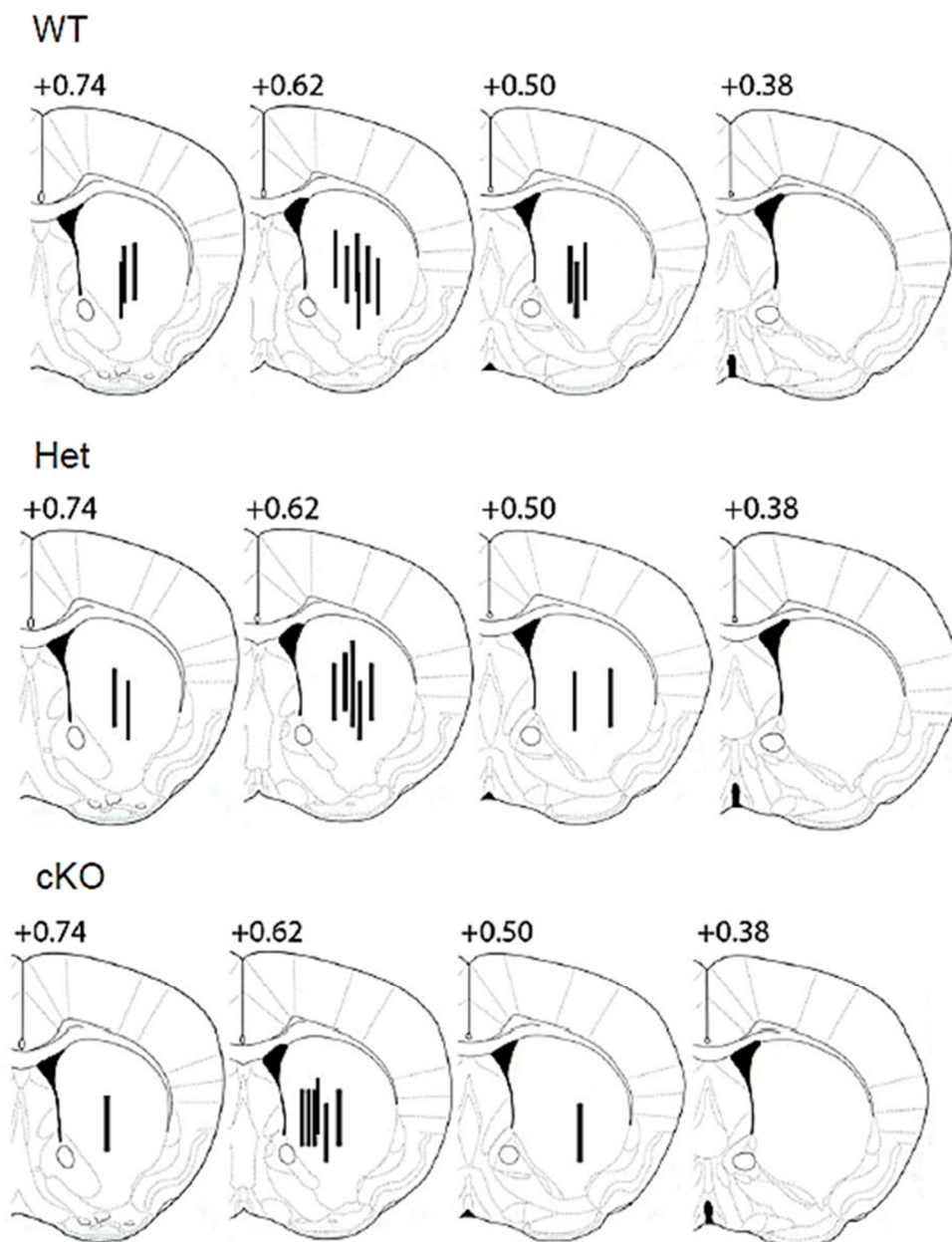
### Het



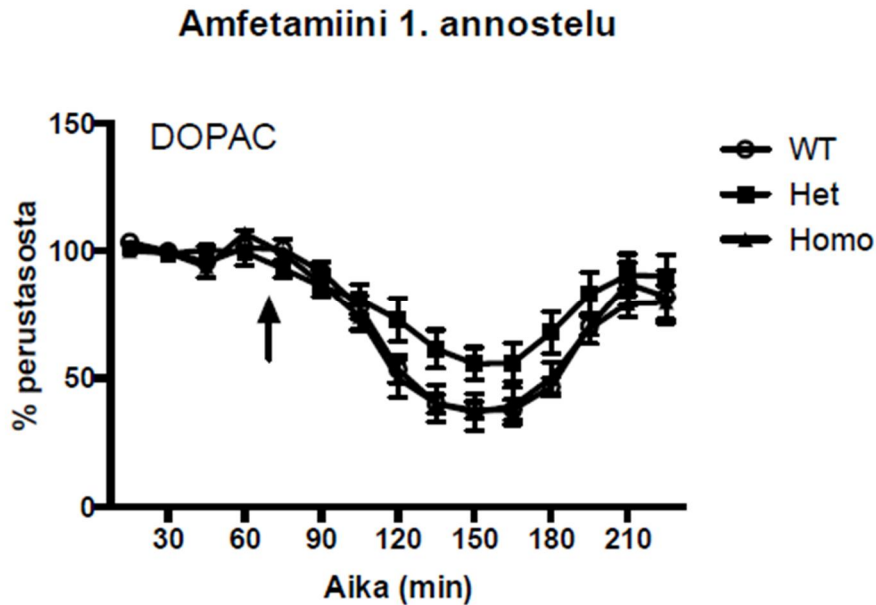
### Homo



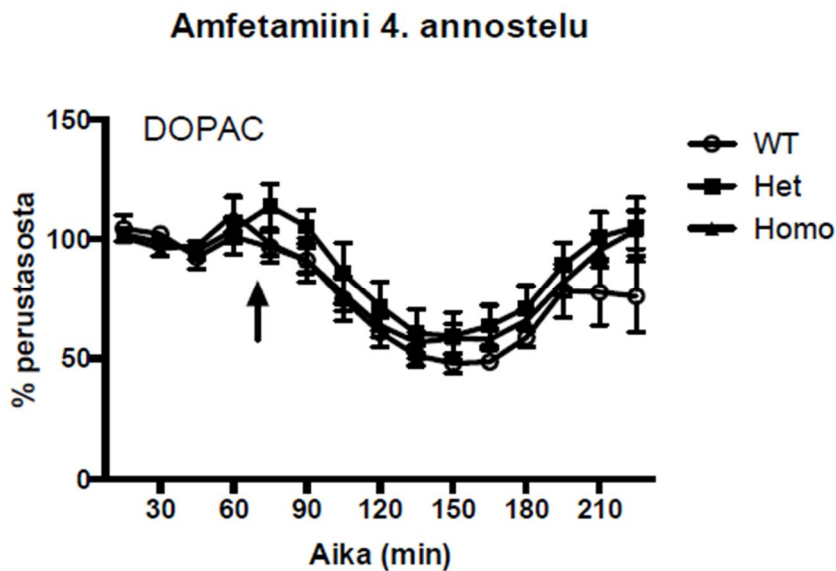
Liite 2: Mikrodialyysikoettimien paikat striatumissa GDNF-cKO-hiirillä. Numerot kuvien päällä kertovat etäisyyden bregmasta millimetreinä. Merkit on piirretty lähimpään vastaavaan kuvaan, eikä päällekkäin meneviä kohtia ole merkitty näkyville. (Franklin ja Paxinos 1997)



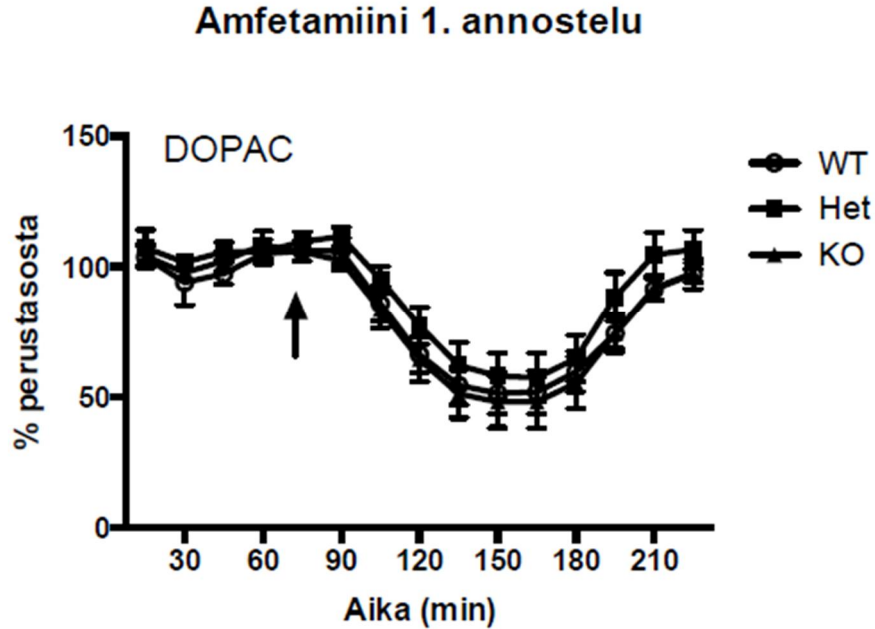
Liite 3: Amfetamiinistimulaation (100  $\mu$ M, 60 min) vaikutus solunulkoiseen DOPAC-pitoisuuteen MEN2B-hiirillä ensimmäisen annostelukerran jälkeen mikrodialyysillä mitattuna. Amfetamiinin annostelun aloitus on merkitty nuolella. N(Wt)=6, n(Het)=9, n(Homo)=9. Pitoisuudet on merkitty prosentuaalisena muutoksena perustasosta.



Liite 4: Amfetamiinistimulaation (100  $\mu$ M, 60 min) vaikutus solunulkoiseen DOPAC-pitoisuuteen MEN2B-hiirillä ensimmäisen annostelukerran jälkeen mikrodialyysillä mitattuna. Amfetamiinin annostelun aloitus on merkitty nuolella. N(Wt)=7, n(Het)=10, n(Homo)=11. Pitoisuudet on merkitty prosentuaalisena muutoksena perustasosta.



Liite 5: Amfetamiinistimulaation (100  $\mu$ M, 60 min) vaikutus solunulkoiseen DOPAC-pitoisuuteen GDNF-cK -hiirillä ensimmäisen annostelukerran jälkeen mikrodialyysillä mitattuna. Amfetamiinin annostelun aloitus on merkitty nuolella. N(Wt)=12, n(Het)=10, n(KO)=8. Pitoisuudet on merkitty prosentuaalisena muutoksena perustasosta.



Liite 6: Amfetamiinistimulaation (100  $\mu$ M, 60 min) vaikutus solunulkoiseen DOPAC-pitoisuuteen GDNF-cKO-hiirillä ensimmäisen annostelukerran jälkeen mikrodialyysillä mitattuna. Amfetamiinin annostelun aloitus on merkitty nuolella. N(W4)=11, n(Het)=8, n(KO)=4. Pitoisuudet on merkitty prosentuaalisena muutoksena perustasosta.

